



**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA**

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ARCILLAS Y  
APLICACIÓN COMO MATERIALES BIOCIDAS”**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ESPECIALIDAD:  
**FISICOQUÍMICA**

PRESENTA:  
**MÓNICA CRUZ HERNÁNDEZ**

DIRECTOR:  
**DR. GEOLAR FETTER**

CODIRECTOR:  
**DR. GERARDO LANDETA CORTÉS**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	I
ABSTRACT .....	II
INTRODUCCIÓN .....	III
JUSTIFICACIÓN .....	IV
OBJETIVOS .....	VI
General .....	VI
Particulares .....	VI
1. MARCO TEÓRICO .....	1
1.1. Microorganismos.....	1
1.1.1. Bacterias .....	1
1.1.2. Bacterias Gram Negativas .....	2
1.1.3. Bacterias Gram Positivas .....	3
1.1.4. <i>Corynebacterium</i> .....	4
1.1.4.1. <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> .....	4
1.2. Hongos .....	5
1.2.1. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	5
1.2.1.1. <i>Trichophyton mentagrophytes var interdigitale</i> .....	6
1.3. Arcillas .....	9
1.3.1. Arcillas aniónicas .....	9
1.3.2. Fórmula general y estructura de las arcillas aniónicas .....	10
1.3.3. Naturaleza de los Cationes .....	11
1.3.4. Naturaleza de los aniones .....	11
1.3.5. Aplicaciones de las hidrotalcitas (HT) .....	12
1.3.6. Métodos de síntesis de hidrotalcitas .....	13
1.3.6.1. Métodos sol-gel .....	13
1.3.6.2. Métodos de síntesis de hidrotalcitas por ultrasonido.....	13
1.3.6.3. Método empleando irradiación con microondas .....	13
1.3.7. Arcillas catiónicas .....	14
1.3.7.1. Haloisita .....	14
1.4. Polímeros superabsorbentes .....	15
1.4.1. Poliacrilato de sodio .....	16
1.5. Melanina.....	17

2. CAPITULO DOS: DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	19
2.1. Síntesis de las hidrotalcitas de referencia y sus correspondientes óxidos mixtos .....	19
2.2. Preparación de los compósitos HT/PA.....	21
2.2.1. Preparación de compósitos HT/PA-Ult.....	22
2.2.2. Preparación de compósitos HT/PA-Con .....	23
2.2.3. Preparación de los compósitos HT/PA-Dir .....	24
2.2.4. Preparación de compósitos HT/PA-Mec.....	25
2.3. Cepa bacteriana de referencia .....	30
2.3.1. Evaluación de la actividad bactericida de los materiales .....	32
2.3.2. Construcción de correlación de UFC vs DO de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> .....	32
2.4. Materiales híbridos melanina-hidrotalcita.....	26
2.4.1 Síntesis .....	27
2.4.1.1. Haloisita natural .....	27
2.4.2. Síntesis de la hidrotalcita.....	27
2.4.3. Obtención de melanina.....	28
2.4.4. Procedimiento de síntesis de los materiales híbridos hidrotalcita y haloisita con melanina	29
2.4.5. Evaluación de la actividad fungicida del material híbrido .....	30
2.5. Métodos de caracterización .....	30
2.5.1. Difracción de rayos X .....	31
2.5.2. Espectroscopia de infrarrojo.....	31
2.5.3. Fisisorción de nitrógeno .....	31
2.5.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	31
3. CAPITULO TRES: RESULTADOS.....	34
3.1. Evaluación antimicrobiana de las hidrotalcitas .....	34
3.2. Curva de correlación de UFC vs DO de <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> .....	45
3.3. Conclusiones parciales .....	47
3.4. Difracción de rayos X (DRX) .....	34
3.5. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	35
3.6. Fisisorción de nitrógeno .....	37
3.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	38
3.8. Análisis termogravimétrico .....	40
3.9. Evaluación de la actividad fungicida del material híbrido .....	48
3.10 Conclusiones parciales .....	51

Conclusiones generales.....	52
Referencias .....	53
ANEXO 1 .....	62
PUBLICACIÓN DERIVADA .....	63

## **DEDICATORIAS**

*Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A mi madre, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, por sus consejos y por la motivación constante que ha permitido ser una buena persona.*

*A mis hermanos y familia son fuente de energía cuando los necesito.*

*Por enseñarme a superarme cada día, alcanzar los sueños que uno se propone y sobre todo ser buena persona sobre cualquier dificultad dedico este trabajo a la memoria de mi amiga Ángeles y de mis tíos Armando y Carlos.*

## AGRADECIMIENTOS

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo, merece reconocimiento especial mi Madre que con su amor y consejos me dio el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible, por escucharme y siempre tener algo que decirme.

Asimismo, agradezco infinitamente a mis hermanos Jesús, Patricia y José Eduardo que con sus palabras me hacían sentir orgulloso de lo que soy y de lo que les puedo enseñar.

A toda mi familia por su apoyo y cada consejo, a mis tíos y a mis primos, pero en especial a mi primo Josué porque a su edad me enseñó a superarme cada día, a conseguir cada meta que nos proponemos a que cada camino es difícil pero posible de llegar, te quiero mucho.

La amistad cuando es verdadera es algo maravilloso, ya que nos va a acompañar durante toda la vida, dándonos alegrías, compartiendo con nosotros momentos únicos e inolvidables te Verito mi mejor amiga agradezco por todo tu apoyo en todos los aspectos por tu motivación a terminar cada proyecto en mi vida, te quiero mucho.

A Ana, Javi, Fercho, Oscar, Dulce, Are, Cil, Lupita, Martín, Fer, Gonzalo por ser buenos amigos y estar presentes en mi proyecto, gracias por su motivación.

A mi director de tesis Dr. Geolar Fetter, por haberme brindado toda su paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis, gracias por transmitirme de un modo singular su conocimiento, por sus consejos que ayudan a formar a investigadores y excelentes personas muchas gracias por su amistad. Al Dr. Gerardo Landeta por apoyarme y guiarme en una nueva rama del conocimiento, por su paciencia en mis tropiezos gracias por sus consejos.

Al Dr. Nemesio Villa Ruano por apoyarme en la realización de las pruebas fungicidas como en la caracterización de los materiales, sus consejos para la realización de este proyecto.

A mis sinodales por haber asumido la importante tarea revisar y corregir de este trabajo, por su interés, motivación apoyo y crítica. Un especial agradecimiento por este privilegio.

A mis compañeros de laboratorio Carlos, Luis, Marco por apoyarme en este proceso, pero sobre todo agradezco a Franchescoli por cada consejo, apoyo en cualquier cosa, en brindarme su conocimiento y guiarme en este proceso, por hacerme una persona más autodidactica y ver la ciencia más divertida, pero sobre todo gracias por tú amistad.

Me agradezco a mí misma por poder terminar este proyecto por no dejarme caer, por seguir avanzando en mis estudios, tener tenacidad y seguir conociendo nuevas cosas.



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

Este trabajo fue realizado principalmente en el Laboratorio de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias Químicas. Ahí se efectuaron las síntesis de los materiales y la caracterización por fisisorción de nitrógeno e infrarrojo.



La caracterización de difracción de rayos X, microscopia electrónica de barrido y análisis termogravimétrico se realizaron en el Área do Conhecimento de Ciências Exatas e Engenharias de la Universidade de Caxias do Sul, Brasil.



Las pruebas bactericidas se efectuaron en el laboratorio de Microbiología del Dr. Gerardo Landeta Cortés de la DitCo, BUAP, y las pruebas fungicidas en el Laboratorio del Dr. Nemesio Villa Ruano también de la Ditco, BUAP.



La presente tesis contó con el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. No. de beca 921273.

## RESUMEN

Las bacterias patógenas son microorganismos unicelulares que llegan a representar un grave problema para la salud de los seres vivos. Las infecciones bacterianas se pueden tratar con antibióticos, que se clasifican como bactericidas, si matan bacterias, o como bacterioestáticos, si solo detienen el crecimiento. Existen diversos agentes naturales que presentan propiedades bactericidas, como las arcillas catiónicas o las aniónicas de tipo hidrotalcita. Este trabajo se dividió en dos partes: la primera (Capítulo 2) se enfocó a la síntesis por coprecipitación y posterior tratamiento de ultrasonido de hidrotalcitas de ZnAl y CuZn a diferentes relaciones molares  $M^{II}/M^{III}$  de 4:1, 3:1 y 2:1 para formar compósitos conformados por hidrotalcita y poliacrilato de sodio con una relación porcentual 90/10, resultando en sólidos para aplicación en medicina. Los nuevos compósitos fueron probados con la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* bacteria que se encuentra en la orina y que puede provocar infecciones. Debido a la eficiencia de estos compósitos se podrían usar en pañales para adultos para disminuir o eliminar las infecciones y los malos olores causados por esta bacteria. Las pruebas bactericidas se probaron por una modificación del Método Kirby Bauer.

La segunda parte del trabajo (Capítulo 3) se enfocó a la síntesis de nuevos materiales conformados por melanina y arcillas de tipo catiónica y aniónica. Estos materiales fueron evaluados en la eliminación del hongo *Trichophyton mentagrophytes* causante de infecciones epidérmicas. Los nuevos materiales híbridos obtenidos se caracterizaron por difracción de rayos X, por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, microscopia electrónica de barrido, fisisorción de nitrógeno y análisis termogravimétrico. Las pruebas antibacterianas demostraron que los materiales híbridos Mel-HT y Mel-Hall presentaron actividad fungicida con concentraciones mínimas de 4.0 mg/mL y 2.5 mg/mL, respectivamente, indicando la alta actividad tanto de la arcilla aniónica como de la catiónica, en donde esta última resultó más efectiva.

## ABSTRACT

Pathogenic bacteria are single-celled microorganisms that represent a serious problem for the health of living beings. Bacterial infections can be treated with antibiotics, which are classified as bactericidal if they kill bacteria, or as bacteriostatic if they only stop growth. There are several natural agents having bactericidal properties, such as cationic clays or hydrotalcite-type anionic clays. This work is divided into two parts: the first (Chapter 2) focused on the synthesis by coprecipitation and subsequent ultrasound treatment of hydrotalcites ZnAl and CuZn at different molar ratios  $M^{II}/M^{III}$  of 4:1, 3:1 and 2:1 to form composites made of hydrotalcite and polyacrylate with a 90/10 percentage ratio, resulting in original solids for application in medicine. The new composites were tested on *Corynebacterium ammoniagenes*, a bacterium found in urine that can produce skin infections. Considering the efficiency of these compounds, it could be used in adult diapers to reduce infections and bad odors caused by this bacterium. The bactericidal tests were tested by is a modification of the Kirby Bauer Method.

The second part of the work (Chapter 3) focused on the synthesis of new materials made up of melanin and cationic and anionic clays. These materials were evaluated in the elimination of the *Trichophyton mentagrophytes* fungus that causes epidermal infections. The obtained new hybrid materials were characterized by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, nitrogen physisorption and thermogravimetric analysis., antibacterial tests showed that the hybrid materials Mel-HT and Mel-Hall showed activity against the fungus with minimum concentrations of 4.0 mg/mL and 2.5 mg/mL respectively.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas se pueden tratar con antibióticos, que se clasifican como bactericidas, si matan bacterias, o como bacterioestáticos, si solo detienen el crecimiento bacteriano. Existen muchos tipos de antibióticos y cada tipo inhibe un proceso que difiere en el patógeno con respecto al huésped. Los metales pesados y sus sales, como la plata, el nitrato de plata o el cloruro de mercurio son agentes bactericidas muy eficaces y han sido utilizados desde la antigüedad. Estos metales y sus sales son muy tóxicos y pueden afectar al medio ambiente, por lo cual sus usos son restringidos o prohibidos. Elementos más ligeros como el zinc o cobre ejercen un efecto tóxico sobre las bacterias, pero su uso no es tan dañino al ser humano como en el caso de los metales más pesados, donde la plata, muy utilizada como bactericida, es uno de los más tóxicos [Ishige y col., 2005]. Los metales más ligeros pueden integrar materiales sólidos complejos como lo son las arcillas, en donde los metales que conforman la estructura laminar de las arcillas pueden ser progresivamente liberados del material al contacto con un medio que contiene bacterias. Por esta particularidad, las arcillas de tipo hidrotalcita pueden ejercer una alta actividad en la destrucción o inhibición microbiana [Lobo-Sánchez y col., 2018; Rocha Oliveira y col., 2015]. Parte de su efectividad está en la propiedad que tienen los metales para donar y aceptar electrones. Por lo cual, el metal es capaz de alterar la integridad de las membranas celulares de los microorganismos, causando oxidación y por tanto daños en los componentes grasos de su estructura. Por otra parte, se sabe que el metal se liga a proteínas que los microorganismos requieren para su funcionamiento y, al hacerlo, inhiben su crecimiento. El cobre, por ejemplo, inactiva microorganismos de tipo hongos, levaduras, virus y bacterias [Lin y col., 1998]. Los metales con actividad bactericida pueden presentarse directamente en la composición de las arcillas o en moléculas que son adsorbidas en las arcillas que podrían aumentar la actividad antimicrobiana.

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos o los hongos. Estas enfermedades pueden transmitirse, directa o indirectamente, de una persona a otra. Existen bacterias que habitan en la piel, boca, vías respiratorias, en sistema digestivo o urinario. Para poder combatir estas enfermedades existen compuestos orgánicos como los antibióticos los cuales pueden matar a los microorganismos, pero tienen la desventaja de matar a los microorganismos no patógenos. Actualmente se están estudiando sólidos inorgánicos que son menos dañinos a los sistemas vivos. Recientemente se ha reportado el estudio de sólidos inorgánicos como zeolitas, arcillas y óxidos metálicos impregnados con metales pesados como la plata, el zinc o el cobre que se han utilizado ampliamente para mostrar una alternativa en la eliminación de microorganismos patógenos [Lobo-Sánchez y col.,2018]. Estos sólidos exhiben altas propiedades bactericidas debido, en parte, a sus altas áreas de superficie que proporcionan un buen contacto con microorganismos; sin embargo, el principal factor es su composición química. Se ha demostrado que los soportes inorgánicos también contribuyen a la eliminación de bacterias, especialmente cuando los soportes presentan un carácter básico [Huang y col., 2005]. En la actualidad, las arcillas están siendo fabricadas a “medida del cliente”, es decir, con propiedades específicas, en donde se programan la composición química y la estructura deseadas. Las propiedades de adsorción y reactividad química son las más demandadas a las arcillas, pero la de intercambio iónico también es muy importante. Con esta propiedad se puede modificar ampliamente su estructura intercambiando las especies interlaminares originales por especies con actividad microbiana como algunos antibióticos. Es también a partir de esta propiedad que derivan los dos principales tipos de arcillas, las catiónicas y las aniónicas (comúnmente llamadas hidrotalcitas). Las primeras intercambian cationes y son ácidas mientras que las segundas intercambian aniones y son básicas. Las catiónicas son abundantes en la naturaleza, mientras que las aniónicas son escasas. Considerando que las arcillas pueden ser modificadas estructural y químicamente, estas pueden usarse para la elaboración de materiales capaces de albergar, por ejemplo, metales oligodinámicos, responsables de inhibir y matar microorganismos patógenos como bacterias, hongos, etc. Además, el carácter básico, dado por la presencia de grupos hidroxilos, puede promover el ataque a los microorganismos a través de la formación de especies altamente oxidantes. Las

arcillas, ricas en hidroxilos y albergando metales oligodinámicos en sus estructuras son candidatos perfectos para empleo como agentes antimicrobianos. Es por esto que en este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de arcillas catiónicas, aniónicas y compósitos, los cuales originan compuestos bioactivos empleándose contra bacterias y hongos que provocan infecciones cutáneas [Segura-Pérez y col., 2020].

## OBJETIVOS

### General

Sintetizar híbridos de poliacrilato de sodio o melanina y arcillas catiónicas, o aniónicas con diferentes composiciones y relaciones metálicas molares, para evaluarlos como agentes antimicrobianos y fungicidas.

### Particulares

- Sintetizar hidrotalcitas de composición ZnAl y CuZnAl a diferentes relaciones metálicas molares  $M^{II}/M^{III}$  de 4:1, 3:1 y 2:1.
- Sintetizar híbridos hidrotalcita/poliacrilato de sodio por los métodos: mezcla mecánica de hidrotalcita con poliacrilato de sodio, síntesis directa de hidrotalcita sobre poliacrilato de sodio, mezcla con gel precursor de hidrotalcita con cristalización vía ultrasonido y mezcla con gel precursor de hidrotalcita vía calentamiento convencional.
- Caracterizar las muestras por diferentes técnicas como difracción de rayos X, espectroscopia de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido, fisisorción de nitrógeno y análisis térmicos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los híbridos de poliacrilato frente a la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* por el método Kirby Bauer modificado.
- Sintetizar híbridos conformados por melanina y una hidrotalcita de ZnAl 3:1.
- Sintetizar híbridos conformados por melanina y haloisita de origen natural.
- Evaluar la actividad fungicida de los híbridos de melanina contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1. Microorganismos

Los microorganismos son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra ya que colonizan: el suelo, agua y aire. Participan de forma vital en todos los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre. Los microorganismos son clave para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, pues participan en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos para sobrevivir y enfrentar los retos del futuro. Los microorganismos se agrupan en dos categorías: procarióticos y eucarióticos [Montaño y col., 2010]. En la primera están las arqueobacterias y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran hongos, algas y protozoarios.

### 1.1.1. Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas que poseen una pared celular de peptidoglucano cuya estructura es semejante a una malla, que rodea a las membranas para protegerlas del entorno. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan sólo en el interior de células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico [Murray,2009]. Las estructuras y las funciones bacterianas han sufrido un proceso evolutivo con el fin de adaptarse a estas condiciones adversas. Algunas de estas diferencias conforman la base de la acción de los agentes antimicrobianos.

La morfología nos da una información primaria sobre el tipo de bacteria, pero no de forma concluyente [Castro, 2014]. Las formas básicas son esféricas (coco), bastoncillo o cilíndrica (bacilo), helicoidal (espirilo), en forma de coma (vibrio), espiral (espiropeta), estrella y cuadrangular. Los cocos pueden aparecer: aislados, en parejas (diplococos), en cadenas (estreptococos), en racimos (estafilococos). Los bacilos pueden aparecer también aislados, en parejas (diplobacilos) o en cadena (estreptobacilos).

La tinción de Gram es una prueba útil y de fácil realización que permite diferenciar las dos principales clases de bacterias con el objeto de instaurar un tratamiento. Con la tinción Gram, las bacterias Gram positivas se tiñen de color púrpura, debido a que el colorante queda atrapado en la capa de peptidoglucano. A comparación de las baterías Gram positivas, las

bacterias Gram negativas presentan una delgada capa de peptidoglucano incapaz de retener el colorante usado en la tinción, por lo que las células se tiñen con el colorante de contraste y adquiere un color rojo. La tinción de Gram no es una prueba fiable de tinción de bacterias en medios de cultivos con escasos nutrientes (por ejemplo, cultivos viejos o en fase estacionaria) o tratados con antibióticos debido a la degradación del peptidoglucano por parte de estos fármacos [Murray, 2009].

### **1.1.2. Bacterias Gram Negativas**

La estructura de la pared de las bacterias Gram negativas es más compleja que la de las bacterias Gram positivas. Una pared celular de una bacteria Gram negativa contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglucano que representa de un 5 % a 10 % del peso de la pared celular. Además, la pared celular Gram negativa no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos. En la pared externa de la capa peptidoglucano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de las bacterias Gram negativas. La zona comprendida entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la superficie interna de la membrana externa se conoce como espacio periplásmico [Murray, 2009]. Este espacio contiene diversas enzimas hidrolíticas importantes para la degradación y metabolización por la bacteria de las macromoléculas de gran tamaño. Habitualmente estas enzimas son proteasas, fosfatasa, lipasas, nucleasas y enzimas metabolizadoras de hidratos de carbono. Las membranas externas son características de las bacterias Gram negativas. La membrana externa forma una especie de saco rígido alrededor de la bacteria. La membrana externa mantiene la estructura bacteriana y constituye una barrera impermeable a moléculas de gran tamaño, así como moléculas hidrófobas. También ofrece protección frente a diversas condiciones ambientales. La membrana externa posee una configuración asimétrica y es una bicapa lipídica. La zona interna de esta membrana externa contiene los fosfolípidos que normalmente aparecen en las membranas bacterianas. Sin embargo, la zona externa está formada fundamentalmente por una molécula antipática denominada lipopolisacárido.

### 1.1.3. Bacterias Gram Positivas

Una bacteria Gram positiva posee una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano (150 a 500 Å) que rodea la membrana citoplásmica. El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla y es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática. El peptidoglucano es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de las bacterias en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan [Murray, 2009]. Durante una infección, el peptidoglucano puede interferir en la fagocitosis y estimular diversas respuestas inmunitarias, como procesos pirogénicos (es decir, que inducen la aparición de fiebre). El peptidoglucano puede degradarse mediante el tratamiento con lisozima. La lisozima es una enzima presente en la mucosidad y lágrimas del ser humano donde se encuentra en cantidades comprendidas entre 3.000 y 5.000 µg/mL y protege frente a bacterias y virus. En la saliva protege frente a una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos de diferentes especies de *Candida* [Samaranayake y col., 2009]. Esta enzima es capaz de degradar el esqueleto de glucano del peptidoglucano. Sin el peptidoglucano, la bacteria sucumbe a las grandes diferencias de presión osmótica existentes a uno y a otro lado de la membrana citoplasmática y experimenta un fenómeno de lisis. La eliminación de la pared celular produce un protoplasto, el cual experimenta un proceso de lisis a no ser que se estabilice osmóticamente.

Una bacteria Gram positiva puede poseer también otros componentes, como los ácidos teicoicos, lipoteicoicos, y polisacáridos complejos (generalmente denominados polisacáridos). La proteína M de los estreptococos y la proteína R de los estafilococos también se asocian al peptidoglucano. Los ácidos teicoicos son polímeros hidrosolubles de fosfatos de poliol que están unidos al peptidoglucano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática. Estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que se diferencian de los serotipos bacterianos y favorecen la fijación a otras bacterias y a receptores específicos localizados en la superficie de las células de los mamíferos (adherencia). Los ácidos teicoicos constituyen factores de virulencia. Los ácidos lipoteicoicos son expulsados hacia el medio circundante y al medio intercelular del

organismo anfitrión y aunque débiles, son capaces de desencadenar respuestas inmunitarias semejantes a las de las endotoxinas.

Entre los varios tipos de bacterias Gram positivas este estudio se enfocó en la *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871) que es una bacteria de la microbiota del tracto intestinal humano. Este microorganismo difiere de otros presentes en la flora gastrointestinal humana por ser un productor de amoníaco excepcionalmente fuerte. La producción de amoníaco a partir de la urea presente en el tracto intestinal se debe a que la enzima ureasa en la *Corinebacterium ammoniagenes* hidroliza la urea para formar dióxido de carbono, amoníaco y compuestos derivados, potentes irritantes responsable del mal olor e inflamación de la piel que permanece en contacto prolongado con la orina.

#### **1.1.4. *Corynebacterium***

Pertenece a la Familia *Corynebacteriaceae*, pueden estar formando parte de la biota y en ocasiones pueden ser patógenas. Inicialmente el género fue definido en base a características morfológicas: corynebacteria proviene del griego κορυνη (corunë), bastón nudoso, y βακτηριον (*bacterion*), bastoncillo. En general son bacilos grampositivos, pleomórficos que se pueden agrupar en empalizada o letras chinas, cuyo tamaño oscila en 2-6 µm de longitud y 0.5 µm de diámetro, catalasa (+), no esporulados, inmóviles, no encapsulados, anaerobios facultativos.

##### **1.1.4.1. *Corynebacterium ammoniagenes***

Este organismo es uno de los saprófitos comunes del tracto intestinal en humanos y otros mamíferos. Bacteria anaerobia facultativa que se mantiene sin movimiento. Este organismo difiere de otros presentes en la flora gastrointestinal humana, por ser un productor de amoníaco [Collins, 1987]. La producción de amoníaco, a partir de la urea que se encuentra presente en el tracto intestinal, se debe a que la enzima ureasa en la *Corynebacterium ammoniagenes*, hidroliza la urea para formar amoníaco y dióxido de carbono:



La *Corynebacterium ammoniagenes* presenta una morfología con una superficie lisa, en forma de bacilo. La bacteria tiene un diámetro que varía de 0.6 a 1.2 µm y una longitud

entre 1.0 a 4.5  $\mu\text{m}$ . Los lípidos de la pared celular de estos microorganismos constituyen más del 60% del peso seco de la pared bacteriana. En sus paredes contienen glucolípidos llamados ácidos micólicos.

El desarrollo de esta bacteria puede controlarse con el uso de agentes bactericidas, como lo son las arcillas aniónicas de tipo hidrotalcita. [León-Vallejo y col., 2019] reportaron estudios preliminares en donde hidrotalcitas de ZnAl fueron eficientes agentes biocidas contra *Corynebacterium ammoniagenes*. No obstante, estudios más profundos en este sentido son requeridos.

## 1.2. Hongos

Los hongos son microorganismos eucariotas que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, sistema de endomembranas, pueden existir en una forma unicelular o en forma de filamentos. Los hongos son organismos que se caracterizan por ser heterótrofos, es decir no fabrican su propio alimento como lo hacen las plantas, esto se debe a la falta de clorofila y de pigmentos fotosintéticos, es por ello, que tienen que relacionarse con otros seres vivos para poder sobrevivir, buscando nutrientes orgánicos para alimentarse [Rocabado 2011].

Presentan una pared celular de quitina (compuesto resistente que forma el exoesqueleto de los insectos) y no de celulosa como las plantas. Son inmóviles y se reproducen sexual y asexualmente por medio de esporas. Su nutrición se realiza por absorción. A diferencia de los animales, los hongos no ingieren el alimento, sino que lo digieren, primeramente, a través de la producción de enzimas que son vertidas sobre la materia orgánica para degradarla y luego absorberla. Debido a todas estas características los hongos pertenecen al “Reino Fungi”.

### 1.2.1. *Trichophyton mentagrophytes*

*Trichophyton mentagrophytes* es un complejo de hongos filamentosos *hialinos septados* y *queratinolíticos*, perteneciente a la familia *Arthrodermataceae*. El complejo *Trichophyton mentagrophytes* es el segundo agente etiológico aislado en dermatofitosis de piel y uña en humanos y animales. *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton sp.* se aíslan principalmente en lesiones de piel, pelo y uñas de animales tales

como erizos y roedores; y con menor frecuencia se aíslan en lesiones de piel, barba y cuero cabelludo de trabajadores rurales.

*Trichophyton mentagrophytes* es un hongo de distribución mundial, produce colonias en Sabouraud dextrosa agar planas, de color blanco o crema con una superficie pulverulenta o aterciopelada y pigmento en el reverso amarillento o café-rosado, que con frecuencia se hace rojo-café con el tiempo; se encuentran numerosos microconidios semiesféricos o piriformes, con algunas hifas en espiral y clamidoconidios esféricos que se hacen más abundantes en cultivos viejos; también se encuentran algunos macroconidios en clava, de pared delgada y multiseptados en algunos cultivos. Hidroliza urea en 5 días y la perforación de pelos es positiva. Su significancia clínica se refiere a que es antropofílico, causando con frecuencia tiña de los pies crónica, particularmente de tipo vesicular, tiña del cuerpo (más frecuentemente de las ingles), y algunas veces invasión superficial de la uña [Fernández y col., 2002].

Produce lesiones inflamatorias en la piel o en la piel cabelluda en humanos, particularmente en trabajadores rurales. Puede ocurrir querion en la piel cabelluda o en la barba. Los pelos invadidos muestran una infección ectoendotrix de tipo microide, pero no fluorescencia con luz de Wood.

#### **1.2.1.1. *Trichophyton mentagrophytes var interdigitale***

*Trichophyton var interdigitale*, es una de las especies más frecuentemente aisladas de la dermatofitosis humana. Los dos agentes más comunes de tinea pedis son los dermatofitos antropofílicos *Trichophyton mentagrophytes var interdigitale* y *Trichophyton rubrum*. Ambas especies causan condiciones clínicas muy similares. Los aislamientos de *T. mentagrophytes var interdigitale* pueden mostrar sustancial variación en la morfología y apariencia de la colonia, pero estos caracteres pueden alterar mucho en la subcultura y por lo tanto, no son apropiados para su uso como marcadores de cepas fenotípicas [Liu y col., 1997].

Zaias y Rebell han postulado la existencia de una entidad separada conocida como síndrome de *Trichophyton interdigitale* que es causado por cepas antropofílicas de *T. interdigitale*. Este síndrome describe dermatofitos clínica y micológicamente crónica que afecta la piel y las uñas. La tiña del pie y la tiña ungueal causadas por el síndrome de

*Trichophyton interdigitale* se distinguen de las infecciones causadas por *T.rubrum* y *Epidermophyton floccosum* por vesículas características tipo ampolla con un diámetro mayor que 2 mm en la delgada piel plantar del arco y los lados laterales del arco pie y onicomicosis blanca superficial [Nenoff y col.,2007].

Los orines como desechos del cuerpo humano conducen al crecimiento de microorganismos en la ropa generando olor desagradable, irritación, inflamación e infecciones en la piel, propiciando además un ambiente idóneo para la infiltración de agentes biológicos causantes de las infecciones. Una de las varias bacterias causantes de estas infecciones es la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes*. El desarrollo de esta bacteria puede controlarse con el uso de agentes bactericidas, como lo son las arcillas aniónicas, dentro de las cuales se encuentran las hidrotalcitas, que en su estructura se pueden incorporar iones metálicos como el cobre y el zinc, que han sido reportados como metales biocidas. En la Tabla 1 se muestran algunos metales, compuestos y materiales que se han empleado como agentes bactericidas.

Los materiales compósitos constituidos por hidrotalcitas y poliacrilato presentan particularidades individuales como lo son: la basicidad de los hidrotalcitas, aunado a las diferentes composiciones químicas de éstas, resultando en materiales sólidos capaces de combatir eficientemente microorganismos de alta resistencia. Este proyecto está enfocado en el estudio de materiales compósitos antimicrobianos para un posible uso como componente de pañales desechables, así como en toallas sanitarias y apósitos, pero tiene un potencial de aplicación en los diversos textiles presentes en un nosocomio como: uniformes y batas de hospital, ropa de cama, cortinas, filtros de aire (a base de textiles), alfombras, etcétera.

**Tabla 1.** Materiales empleados como agentes bactericidas.

Material	Mecanismo contra microorganismos	Microorganismos	Referencia
<b>Aceites esenciales</b>	Inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos o de la pared celular. Daño a la membrana celular. Interferencia con procesos metabólicos esenciales	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Burt, 2003
<b>Ácidos</b>	Inhibición del crecimiento bacteriano	<i>Escherichia coli</i>	Mendoza y Cantor, 2012
<b>Compuestos fenólicos</b>	Destrucción de la pared y la membrana celular	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus faecalis</i>	Raibaudi y col., 2006 Beuchat y col., 2001
<b>TiO<sub>2</sub></b>	Destrucción de membrana celular por fotocátalisis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Diplo-coccus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Mahltig y col., 2005 Dastjerdi y col., 2010
<b>Ag</b>	Destrucción de membrana celular y/o enlace con grupo de enzimas celulares	Amplio espectro	Kim y col., 2007 Rai y col., 2009 Qu y col., 2013 Reidy y col., 2013
<b>Au</b>	Las partículas metálicas pueden cambiar la vía del metabolito y el mecanismo de liberación de células bacterianas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	Grace y Pandian, 2007
<b>ZnO</b>	Inhibición del crecimiento bacteriano al desintegrar la membrana celular	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>E. Coli</i> .	Li y col., 2007 Jin y col., 2009
<b>Cu</b>	Desnaturalización de proteínas de la célula bacteriana	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Proteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cubillo y col., 2006 Hu y col., 2005
<b>Agentes basados en galio</b>	Inhibición del metabolismo celular	<i>Clostridium difficile</i>	Valappil y col., 2008
<b>Zeolitas</b>	Desactivación de enzimas vitales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sanguis</i>	Matsumura y col., 2003
<b>Arcillas catiónicas</b>	Destrucción de membrana celular	<i>Escherichia coli</i>	Haydel y col., 2008 Magana y col., 2008
<b>Arcillas aniónicas</b>	Ataque al grupo carbonilo de los enlaces peptídicos de la célula bacteriana. Desnaturalización de proteínas.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis var. niger</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella entérica</i> .	Sunayama y col., 2002 Rocha Oliveira y col., 2015 Lobo-Sánchez y col., 2018

### **1.3. Arcillas**

Las arcillas son minerales naturales que al humedecer se hacen plásticas y están formadas por partículas muy pequeñas cuyo tamaño es inferior a 2  $\mu\text{m}$  [Di Cosimo, 1998]. Químicamente las arcillas se componen de hidrosilicatos e hidróxidos metálicos formadas estructuralmente por el apilamiento de láminas en forma de hojuelas. Si se pone en contacto con el agua, las hojuelas se separan unas de otras y al secarse, ocurre una contracción del espacio que separa las láminas. De acuerdo con su estructura y su composición las láminas pueden presentar carga positiva o negativa. Por lo tanto, las arcillas se subdividen en dos grupos principales: catiónicas y aniónicas.

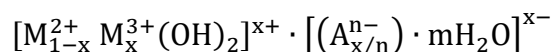
Las arcillas se utilizan en una gran variedad de aplicaciones sofisticadas, entre las más estudiadas se pueden citar el uso como catalizadores y soportes catalíticos en la refinación del petróleo, como agentes secuestrantes de  $\text{CO}_2$  y colorantes en el tratamiento de aguas residuales. Además de los sensores y biosensores, en aplicaciones electroquímicas, como adsorbentes y/o intercambiadores iónicos y en aplicaciones farmacéuticas como agentes dosificadores de fármacos.

#### **1.3.1. Arcillas aniónicas**

Las arcillas aniónicas son materiales sintéticos o naturales, presentan estructuras laminares cargadas positivamente, y entre sus láminas, existen aniones intercambiables para compensar estas cargas. A las arcillas aniónicas comúnmente se les conoce como “hidróxidos dobles laminares” (HDL), como compuestos tipo hidrotalcita o simplemente como hidrotalcita (HT) [León-Vallejo y col., 2019; Jobbágy y Regazzoni, 2011]. De manera específica la hidrotalcita se puede identificar como un polvo blanco similar al talco, descubierta en Suecia en 1842. Está formada por una mezcla hidroxicarbonada de aluminio y magnesio. Después de un tiempo fue descubierta otra mezcla hidroxicarbonada de hierro y magnesio, la cual fue llamada piroaurita nombrada así porque al calentarse presenta un color dorado.

### 1.3.2. Fórmula general y estructura de las arcillas aniónicas

Las arcillas aniónicas tipo hidrotalcita constituyen una clase de materiales útiles para los científicos en el campo de la catálisis o de la medicina. Las arcillas aniónicas son materiales cristalinos sintéticos o naturales, de láminas cargadas positivamente, que adiciona agua y aniones intercambiables en la región interlaminar [Braterman y col., 2004]. Su fórmula general es:



Donde:

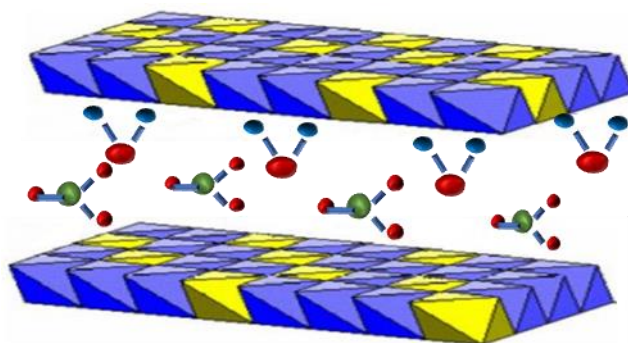
$M^{2+}$  y  $M^{3+}$ : Representa cationes divalentes y trivalentes.

$A^{n-}$ : Es el anión interlaminar con carga n.

$x$ : Es la fracción molar del catión trivalente (entre 0.20 y 0.33).

$m$ : Es el agua de cristalización.

En la Figura 1 se muestra la representación de una hidrotalcita, en la cual la presencia de los cationes  $M^{3+}$  genera las cargas (+) que se estabiliza con los aniones interlaminares  $A^{n-}$ , como los nitratos, normalmente en forma hidratada.



**Figura 1.** Representación estructural de una hidrotalcita [Elaboración propia].

La naturaleza de los cationes, la relación de  $M^{2+}/M^{3+}$ , el método de síntesis, y otros factores [He y col., 2004] determinan las propiedades de las hidrotalcitas. Las hidrotalcitas pueden expandirse mediante la introducción de otros compuestos entre las capas a través de

un proceso conocido como intercalación [Evans y Slade, 2006]. El anión interlaminar puede intercambiarse por muchos otros en medio acuoso u orgánico.

### 1.3.3. Naturaleza de los Cationes

Como los cationes divalentes ( $M^{2+}$ ) y trivalentes ( $M^{3+}$ ) se encuentran entre la estructura laminar de una hidrotalcita, con el cambio en la naturaleza del catión puede modificarse la basicidad y la distancia entre cationes dentro de las láminas [He y col.,2004].

La sustitución de los cationes está básicamente condicionada por el radio iónico, sin embargo, la estructura es lo suficientemente flexible como para permitir la sustitución de cationes trivalentes, divalentes o monovalentes en los huecos octaédricos cuyos radios iónicos varían entre 0.65 y 0.76 Å para cationes divalentes y entre 0.54 y 0.69 Å para cationes trivalentes como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Radios iónicos en Å de algunos cationes [Cavani y col., 1991].

<b>M<sup>2+</sup></b>	<b>Mg</b>	<b>Cu</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>
	0.65	0.69	0.72	0.74	0.74	0.76
<b>M<sup>3+</sup></b>	<b>Al</b>	<b>Ni</b>	<b>Co</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cr</b>
	0.54	0.62	0.63	0.64	0.66	0.69

### 1.3.4. Naturaleza de los aniones

En las arcillas aniónicas se consiguen incorporar un elevado número de aniones (Tabla 3). No existe prácticamente ninguna limitación en la naturaleza de los aniones. El problema de preparar compuestos con aniones que no sean los carbonatos es la alta afinidad que presenta este anión, dificultando la obtención de hidrotalcitas puras sin carbonatos [Bontchev y col., 2003]. Por lo tanto, se debe realizar la síntesis con precursores libres de carbonato y utilizar agua desmineralizada y descarbonatada.

**Tabla 3.** Aniones que pueden situarse entre las láminas de hidrotalcitas aniónicas [Evans y Salde, 2006].

Halogenuros	Oxo-aniones	Complejos metálicos	Aniones orgánicos	Polímeros
F <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	[Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup>	Alquilsulfonatos	Polietilenglicol
Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[PtCl <sub>6</sub> ] <sup>2-</sup>	Ftalocianinas	Poliacrilato

El espesor de la lámina de la hidrotalcita es constante (4.8 Å). Si los aniones son orgánicos el espacio interlaminar aumenta con el número de carbonos presentes y en los aniones inorgánicos aumenta o disminuye en proporción a su radio iónico [Bontchev y col., 2003, Evans y Salde, 2006]. El espacio interlaminar es igual a la diferencia entre el valor de la distancia entre láminas (d), menos 4.8 Å que corresponde al espesor de la lámina. En la Tabla 4 se comparan algunos valores de (d) obtenidos por la intercalación de ciertos aniones.

**Tabla 4.** Distancia interlaminar d (Å) en HT's intercaladas con diferentes aniones [Evans y Slade, 2006].

Anión	OH <sup>-</sup>	(CO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>
d (Å)	7.55	7.65	7.66	7.86	7.96	8.16

Se ha encontrado que las HT's con aniones divalentes son muy estables, por lo que, si se desea realizar un intercambio iónico, se recomiendan utilizar como precursores aniones monovalentes como NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### 1.3.5. Aplicaciones de las hidrotalcitas (HT)

Dependiendo de su composición, cristalinidad, estabilidad térmica y otras propiedades fisicoquímicas, las HT's pueden presentar una gran variedad de aplicaciones, entre las más exploradas se puede citar el uso como: catalizadores, soporte para catalizadores, adsorbentes, intercambiadores aniónicos, estabilizador de PVC, tratamiento de aguas y en aplicaciones farmacéuticas.

### **1.3.6. Métodos de síntesis de hidrotalcitas**

Las hidrotalcitas son poco comunes en la naturaleza, por lo que existen varios métodos de síntesis de hidrotalcitas, los cuales pueden clasificarse en: método sol-gel, método por irradiación de ultrasonido y método por microondas, etc.

#### **1.3.6.1. Métodos sol-gel**

Este procedimiento consiste en la formación de redes o cadenas de átomos que se forman por la dispersión de alcóxidos metálicos de  $Al^{3+}$  y  $Mg^{2+}$  en un líquido (sol), para formar una fase en la cual se obtiene un líquido disperso en un sólido (gel) que se somete a un tratamiento térmico por varias horas, obteniendo así hidrotalcitas cristalinas [López y col. 1996].

#### **1.3.6.2. Métodos de síntesis de hidrotalcitas por ultrasonido**

Este método procura una rápida formación de los cristales, pero con tamaños de partículas menores que las obtenidas normalmente por otras técnicas de caracterización. También, tiene la ventaja de disminuir los tiempos de reacción, pues basta que el gel sea tratado con ultrasonido por un corto tiempo (20-30 min) para conseguir la cristalización, mientras que por otros métodos los tiempos de reacción son de aproximadamente 20 horas o más [León Vallejo y col., 2019, Drezdson, 1988].

#### **1.3.6.3. Método empleando irradiación con microondas**

Se emplean reactores o autoclaves donde es posible ajustar temperatura, tiempo, presión y potencia [Fetter y col., 2001]. El campo eléctrico alterno de las microondas puede actuar sobre un sólido o un líquido de la siguiente forma: mueve las partículas cargadas produciendo una corriente eléctrica oscilante; la resistencia a tal movimiento se traduce en la liberación de calor de conducción. Sobre unidades con momento dipolar el campo eléctrico actúa alineándolo y produciendo un calentamiento dieléctrico. Con este método se obtienen hidrotalcitas de buena cristalinidad y tamaño, asimismo tiene la ventaja de disminuir los tiempos de reacción, pues basta con que el gel sea tratado con microondas por solo un corto tiempo (5-10 min) [Rivera y col., 2006; Fetter y col., 2001] para conseguir la cristalización,

mientras que por otros métodos los tiempos de reacción son de aproximadamente 20 horas o más [Cavani y col., 1991].

### **1.3.7. Arcillas catiónicas**

Este tipo de arcillas tienen la propiedad de sustituir el átomo de silicio por otro de menor carga negativa, compensada por cationes tales como:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , etc. Algunos de estos cationes son fácilmente intercambiables y permiten la interacción de otras especies polares [Martínez y col., 2012].

De acuerdo con su estructura, los minerales de arcilla se agrupan en tres grandes grupos: caolinitas, montmorillonita e ilitas.

Las caolinitas ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) están formadas por una lámina silícica y otra aluminica, que se superpone indefinidamente. Existe unión entre todas las retículas para no permitir la penetración de moléculas de agua entre ellas. En consecuencia, este tipo de arcillas son relativamente estables en presencia del agua.

Las montmorillonitas [ $\text{Si}_8\text{Al}_4(\text{OH})_4\text{O}_{20} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ] están formadas; por la unión entre las retículas del mineral, por lo que las moléculas de agua pueden introducirse en la estructura con relativa facilidad, a causa de las fuerzas eléctricas generadas por su naturaleza.

Lo anterior produce un incremento en el volumen de los cristales, lo que se traduce macrofísicamente, en una expansión; así que entre sus características se puede mencionar su extraordinaria capacidad de adsorción, acidez e intercambio catiónico [Vargas y col., 2008]. Las bentonitas son arcillas que pertenecen a este grupo, originadas por la descomposición química de las cenizas volcánicas y presentan la expansividad típica de este grupo.

Las ilitas [ $\text{K}_{1.5}(\text{Si}_{8-1.5} \cdot \text{Al}_{1.5}) (\text{Al}_4 \cdot \text{Fe}_4 \cdot \text{Mg}_4 \cdot \text{Mg}_6) (\text{OH})_4\text{O}_{20}$ ] están estructuradas análogamente que las montmorillonitas, pero su constitución interna manifiesta tendencia a formar grumos de materia, que reduce el área expuesta al agua por unidad de volumen, por ello su expansividad es menor que las montmorillonitas.

#### **1.3.7.1. Haloisita**

Los nanotubos de haloisita son materiales únicos y versátiles compuestos de doble capa de aluminio, silicio, hidrógeno y oxígeno; sus nanotubos son tubos huecos ultra diminutos

con diámetros generalmente más pequeños que 100 nanómetros (100 mil millonésimas de metro), con longitudes que oscilan entre los 500 nanómetros y más de 1,2 micrones (millonésimas de milímetro). Los nanotubos de haloisita se forman como resultado de la tensión causada por el desajuste de la red entre el dióxido de silicio adyacente y las capas de óxido de aluminio.

Los nanotubos de haloisita son aluminosilicatos naturalmente abundantes, representados por su fórmula química  $Al_4Si_4O_{10}(OH)_8 \cdot 4H_2O$ . Las dimensiones de los nanotubos de haloisita son de 100-200 nm con un diámetro interno de 1-30 nm y un diámetro externo de 30-50 nm. La haloisita presenta características como alta relación de aspecto, luz a nanoescala un número bajo de grupos hidroxilo en la superficie y rigidez [Alam y col.,2020].

#### **1.4. Polímeros superabsorbentes**

Los polímeros superabsorbentes, son un grupo de materiales poliméricos que tienen la habilidad de absorber una importante cantidad de líquido de los alrededores y retenerlo dentro de su estructura, son primordialmente utilizados en la industria de la higiene, en los pañales desechables. Estos polímeros son capaces de absorber hasta 500 veces su propio peso, sin embargo, en soluciones con sal diluida, la absorción del polímero se ve reducida. Normalmente, los polímeros producidos comercialmente absorben 50 g/g de polímero [Hernández., 2010]. Las características de los polímeros superabsorbentes son debidas a la naturaleza del material, los cuales son producidos mediante dos métodos gel-polímero o en polimerización por suspensión inversa. El primero es asociado a partículas de forma irregular mientras que el último describe partículas esféricas. Los polímeros superabsorbentes comercializados más importantes son poliacrilatos covalentemente reticulados y polimerizados. Estos materiales, debido a su estructura interconectada, pueden absorber grandes cantidades de agua sin disolverse.

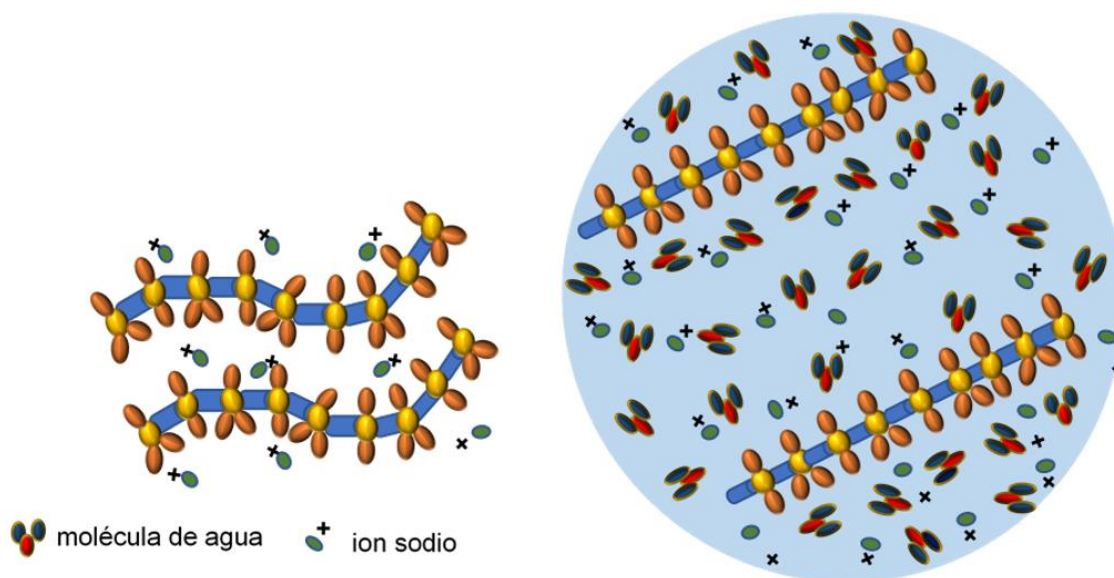
En el polímero superabsorbente se presentan dos estados, los cuales se asocian a un proceso de absorción-desorción que se presenta en las partículas, colapsado e hinchado. La fase de transición entre estos dos estados es resultado de una competencia entre las fuerzas repulsivas que actúan para expandir la red del polímero y fuerzas de atracción que actúan para contraer la red. La matriz macromolecular del polímero es un polielectrolito, un

polímero con grupos ionizables que pueden disociarse en la solución dejando iones de un signo enlazados a la cadena y contraiones en la solución. Por esta razón, hay una alta concentración de iones dentro del polímero, llevando al agua a fluir dentro del polímero mediante osmosis. Otro factor que contribuye a incrementar el hinchado es la solvatación del agua de los grupos hidrofílicos a lo largo de la cadena polimérica [Campos, 2017]

#### 1.4.1. Poliacrilato de sodio

El poliacrilato de sodio (en forma de hidrogel) es un polielectrolito conformado por acrilatos, estos son ésteres que contienen grupos vinílicos (Figura 2). La capacidad de absorción está fuertemente ligada a la presencia de iones en el medio acuoso, los cuales alteran el potencial químico desplazando el equilibrio de absorción. En agua desionizada este adquiere su mayor capacidad de retención. [Arcayo, 2018]

La capacidad de retención o absorción es consecuencia de la estructura del poliacrilato de sodio, el cual contiene grupos carboxilatos de sodio; al entrar en contacto con el agua una gran cantidad de iones de sodio se liberan conservando en la cadena iones libres carboxil de naturaleza aniónica, los cuales se repelen debido a sus cargas negativas extendiendo la cadena del polímero y provocando un aumento en el volumen; en consecuencia, la captación de moléculas de agua estabiliza el polímero.

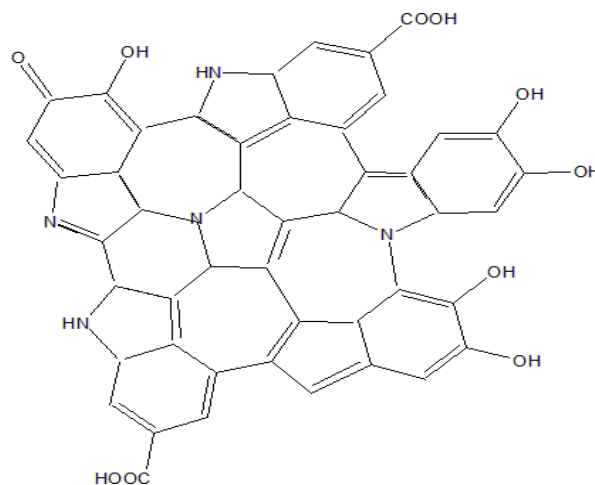


**Figura 2.** Representación del poliacrilato de sodio seco y húmedo [Elaboración propia].

Al entrar el poliacrilato en contacto con el agua, se produce una reacción debida al medio acuoso a través de la cual el poliacrilato desprende iones de sodio y gana afinidad con el agua [Campos 2017]. Tras desprenderse el sodio, se liberan iones negativos de carboxilo que se repelen. Para recuperar la estabilización del compuesto los iones tienen que captar las moléculas de agua. El efecto que se produce posteriormente es el estiramiento de la cadena principal y el aumento del volumen del poliacrilato de sodio.

### 1.5. Melanina

La melanina es un tipo de pigmento biológico producida en la naturaleza por diferentes especies, incluidos los humanos y otros animales, microorganismos y plantas [Costa y col., 2015]. Estos sistemas biológicos producen melanina principalmente para protección contra la luz solar, siendo el ultravioleta la radiación más amenazante. Además, en los humanos, la melanina también sirve para hacer que la piel sea más resistente inhibiendo la penetración de microorganismos en las capas internas de las demás y, por lo tanto, previene infecciones y enfermedades. La melanina se produce en animales mediante la oligomerización de 5,6-dihidroxiindol (DHI) y ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) catalizada por tirosinasa. La melanina más común contiene entre 3 y 9 unidades de monómero, definiendo así a dos tipos principales: eumelanina y feomelanina, que exhiben colores oscuros y rojo-marrón, respectivamente. Aunque las estructuras químicas dependen de muchos factores, la melanina más aceptada descrita en la literatura se identifica con la fórmula del monómero  $C_{46}H_{29}N_5O_{10}$  [Costa y col., 2012], cuya estructura está representada en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructura química del monómero de melanina.

Además de las funciones biológicas de la melanina, hoy en día están comenzando a encontrar aplicaciones importantes, principalmente en los campos tecnológicos, medicinales y farmacológicos [d'Ischia y col., 2015]. El crecimiento vertiginoso en interés de estos compuestos se atribuye principalmente a la estabilidad química, la capacidad de transferencia electrónica y la capacidad de absorber grandes cantidades de energía radiante [Goodman y Bercovich, 2008]. Considerando que algunos materiales inorgánicos del tipo arcilla también tienen la capacidad de actuar contra diversos microorganismos, la combinación de ambos compuestos que forman materiales híbridos podría mejorar las propiedades antimicrobianas de los compuestos individuales.

Un tipo de arcilla que podrían lograr este propósito es la aniónica, también conocida como hidróxidos dobles laminares, compuestos tipo hidrotalcita o simplemente, hidrotalcita. La selección de hidrotalcita puede basarse en sus características únicas como son la: versatilidad en la composición química, aceptando cationes metálicos en su estructura y sus propiedades básicas [Velázquez-Herrera y col., 2020].

## 2. CAPITULO DOS: DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describirán las condiciones experimentales de las técnicas utilizadas para sintetizar las diferentes hidrotalcitas, la obtención de los materiales híbridos HT/poliacrilato de sodio, así como materiales híbridos arcillas/melanina y las técnicas para evaluar la propiedad antimicrobianas y fungicidas tanto de las hidrotalcitas como de los materiales híbridos.

### 2.1. Síntesis de las hidrotalcitas de referencia y sus correspondientes óxidos mixtos

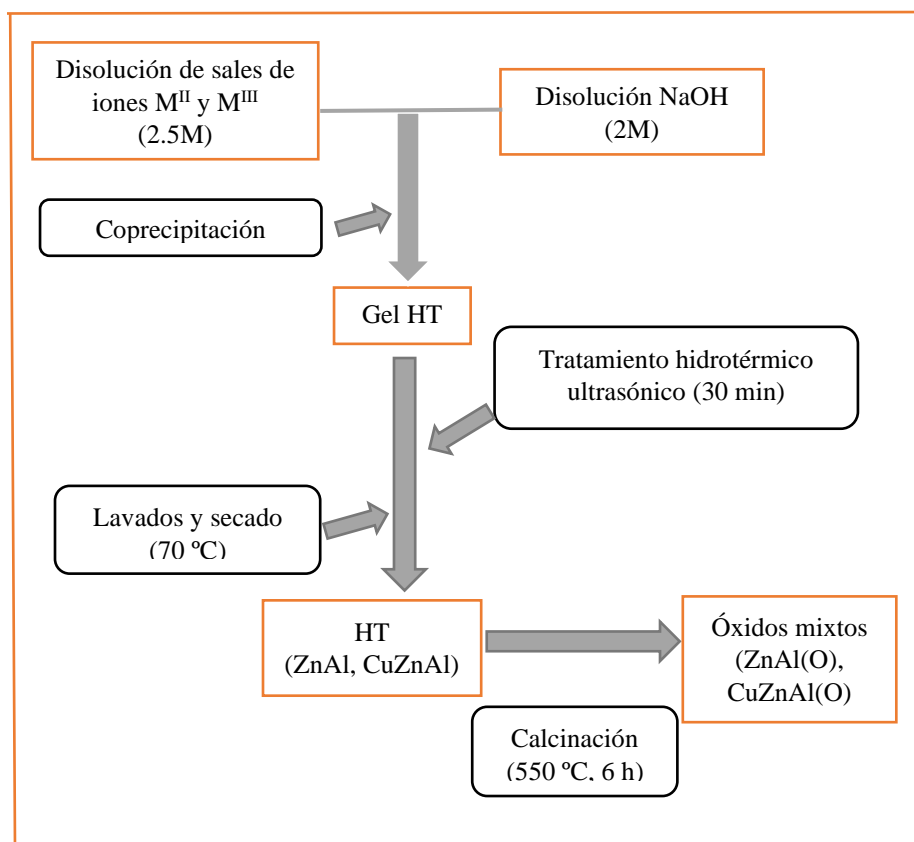
Las hidrotalcitas de composición Zn/Al y CuZn/Al de relación molar  $M^{2+}/M^{3+}$  4:1, 3:1 y 2:1 se sintetizaron por el método descrito a continuación. Se inició con la preparación de dos disoluciones. La primera disolución contuvo los precursores de la hidrotalcita nitratos de zinc o cobre (II) y de aluminio con una concentración 2.5 M de cada sal metálica. Se mezclaron, gota a gota, con el agente precipitante, solución de hidróxido de sodio NaOH al 2 M, controlando los flujos de cada solución. El precipitado se llevó a un equipo de ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) por 30 minutos [Liu y col., 2013]. Posterior a la sonicación, los sólidos se recuperaron de la solución por decantación y fueron lavados con agua destilada (250 mL/g) 3 veces hasta que el pH fuera constante (aproximadamente 8-10), para finalmente ser secados a 70 °C por 24 horas en una estufa. Los sólidos resultantes se pulverizaron en un mortero y se guardan en frascos herméticos. En la Figura 4 se muestra el procedimiento de síntesis. En la Tabla 5 se muestran los diversos reactivos utilizados en la síntesis de hidrotalcitas con sus purezas y procedencia.

Parte de las hidrotalcitas se sometieron a calcinación a 550 °C por 6 horas para obtener los correspondientes óxidos mixtos. Luego, los sólidos obtenidos se pulverizan en un mortero y se guardan en frascos.

En la Tabla 6 se resumen las composiciones de las diferentes hidrotalcitas obtenidas.

**Tabla 5.** Reactivos empleados para la síntesis de las hidrotalcitas.

Reactivo	Masa Molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O</b>	232.59	98	Sigma Aldrich
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	297.49	98	Sigma Aldrich
<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b>	375.13	98	Sigma Aldrich
<b>NaOH</b>	40.00	99	Sigma Aldrich



**Figura 4.** Esquema del procedimiento de síntesis de HT y sus correspondientes óxidos mixtos.

**Tabla 6.** Muestras de hidrotalcitas sintetizadas.

Muestra	Composición	Relación molar
ZnAl 2	Zn/Al	2:1
ZnAl 3	Zn/Al	3:1
ZnAl 4	Zn/Al	4:1
CuZn 2	Cu/Zn/Al	2:1
CuZn3	Cu/Zn/Al	3:1
CuZn 4	Cu/Zn/Al	4:1

## 2.2. Preparación de los compósitos HT/PA

Los compósitos hidrotalcita/poliacrilato de sodio (HT/PA) fueron preparados con una hidrotalcita de composición Zn/Al a una relación metálica molar de 3, dado que esta relación fue la que presentó mayor actividad frente a la *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871) según lo reportado por León-Vallejo y col., (2019). También se prepararon compósitos con la hidrotalcita de CuZnAl a la misma relación metálica molar. La preparación de los compósitos se realizó a través de cuatro métodos: mezcla con gel precursor de hidrotalcita con cristalización vía ultrasonido (HT/PA-Ult), mezcla con gel precursor de hidrotalcita vía calentamiento convencional (HT/PA-Con); preparación directa de hidrotalcita sobre poliacrilato de sodio (HT/PA-Dir) y mezcla mecánica de hidrotalcita con poliacrilato de sodio (HT/PA-Mec). Todos los compósitos fueron preparados a una relación en masa de hidrotalcita/poliacrilato de 10/90.

En la Tabla 7 se muestran los diversos reactivos utilizados en la síntesis de los compósitos con sus purezas y procedencia.

**Tabla 7.** Reactivos empleados para la síntesis de los compósitos hidrotalcitas/poliacrilato de sodio.

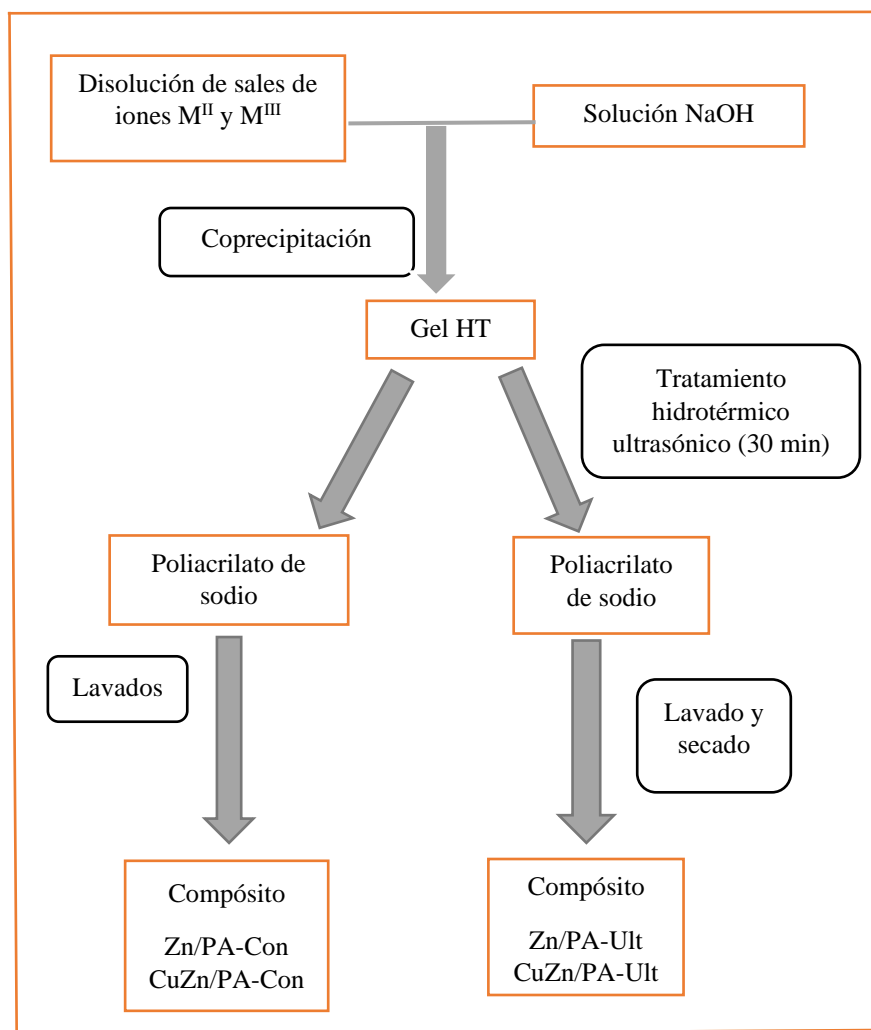
Reactivo	Masa Molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O</b>	232.59	98	Sigma Aldrich
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	297.49	98	Sigma Aldrich
<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b>	375.13	98	Sigma Aldrich
<b>NaOH</b>	40.00	99	Sigma Aldrich
<b>(C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)<sub>n</sub></b>	94.04	97	Sigma Aldrich

### 2.2.1. Preparación de compósitos HT/PA-Ult

Se utilizó el método de mezcla con gel precursor de hidrotalcita y cristalización con ultrasonido para la obtención de los compósitos hidrotalcita/poliacrilato de sodio, el cual se describe a continuación. La primera etapa consiste en reacciones de coprecipitación. Para las hidrotalcitas de Zn/Al y CuZn/Al se emplearon disoluciones de nitratos de los correspondientes metales (Zn, Cu y Al). Todas las disoluciones de nitratos se prepararon a una concentración de 2.5 M. Como agente precipitante se empleó una solución de NaOH 2 M. Para las síntesis se colocaron los precursores de la HT en buretas diferentes; posteriormente se adicionaron dichas disoluciones lenta y simultáneamente en un vaso de precipitados que contenía 50 mL de agua destilada. Se ajustó el flujo de cada una para que el pH se mantuviera constante (aproximadamente a 8-10). Una vez agotadas las disoluciones, el gel resultante se sometió a un proceso de cristalización por ultrasonido (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) durante 30 minutos [Li y col., 2013]. Después del tratamiento con ultrasonido a las se agregó 0.1 g de poliacrilato de sodio obtenido por Sigma Aldrich con densidad de 0.55 g/mL y se dejó reposar por una hora (el tiempo se debió a que en una hora el poliacrilato llega a equilibrio de adsorción) [Arens y col., 2019]. Pasado el tiempo los sólidos resultantes se recuperaron por decantación y se lavaron con agua destilada. Posterior al lavado, los sólidos resultantes se guardaron sin secar en un frasco hermético (muestras Zn/PA-Ult y CuZn/PA-Ult).

### 2.2.2. Preparación de compósitos HT/PA-Con

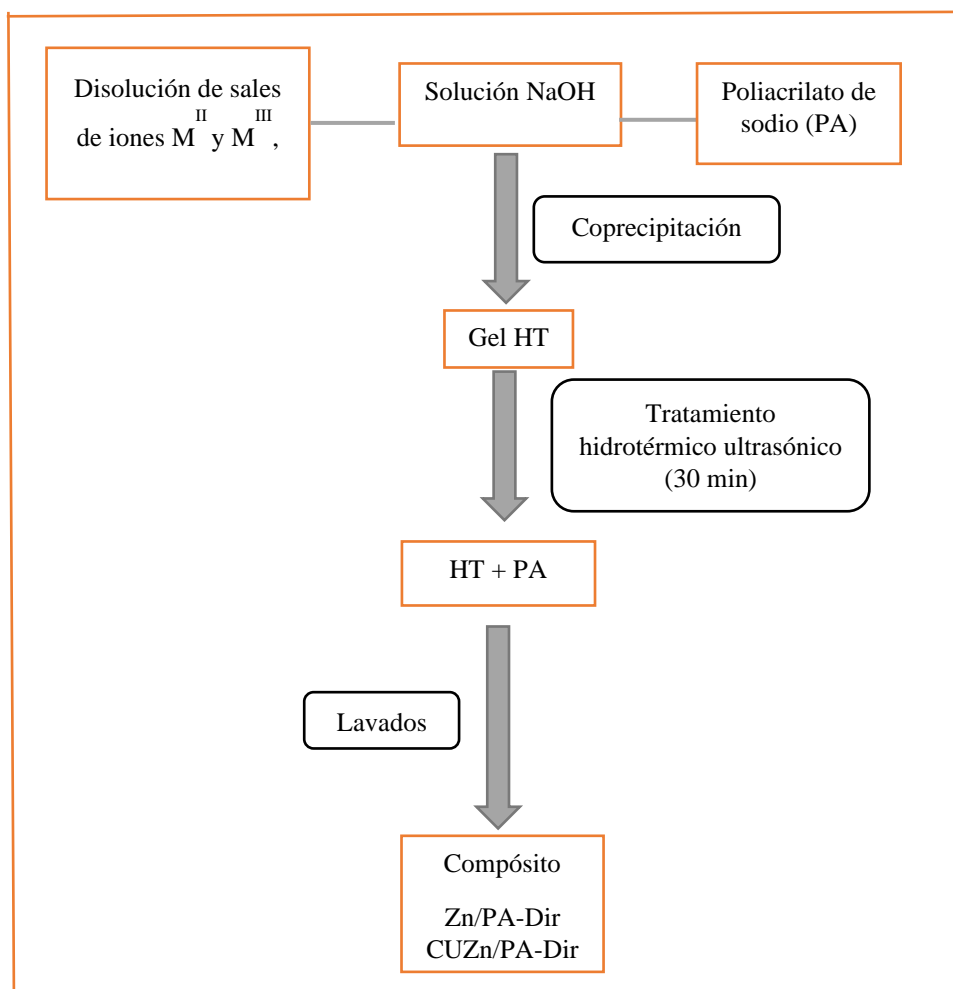
La primera etapa de la síntesis se realizó de la misma manera que los compósitos de HT/PA-Ult descrita anteriormente. Al gel resultante se le agregó 0.1 g de poliacrilato de sodio y se dejó reposar por una hora, tiempo suficiente para que el poliacrilato alcance el equilibrio de adsorción [Arens y col., 2019]. Pasado el tiempo, los sólidos se recuperaron por decantación y se lavaron con agua destilada. Posterior al lavado, los sólidos resultantes se recuperaron y se guardaron sin secar en un frasco hermético (muestras Zn/PA-Con y CuZn/PA-Con). En la Figura 5 se esquematiza el proceso de síntesis de los compósitos por vía ultrasonido y método convencional.



**Figura 5.** Procedimiento de síntesis de los compósitos HT/PA-Ult y HT/PA-Con.

### 2.2.3. Preparación de los compósitos HT/PA-Dir

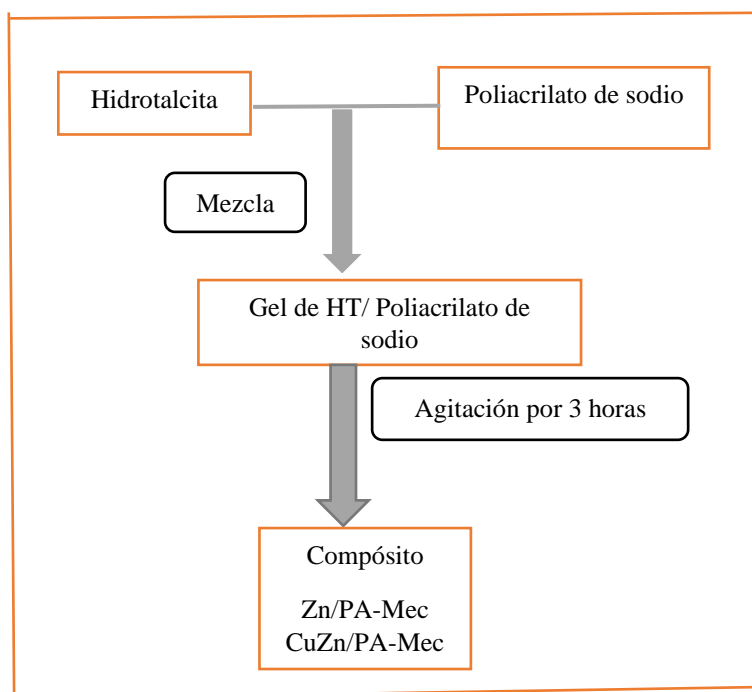
Se colocaron los precursores de la HT en buretas diferentes; posteriormente se adicionaron dichas disoluciones lenta y simultáneamente en un vaso de precipitados que contenía 50 mL de agua destilada y 0.1 g de poliacrilato previamente hidratado, ajustando el flujo de cada bureta para que el pH se mantuviera constante (aproximadamente de 8 a 10). Una vez agotadas las disoluciones, el gel resultante se trató con ultrasonido por 30 minutos. Después del tratamiento con ultrasonido los sólidos se recuperaron por decantación, se lavaron con agua destilada y se guardaron sin secar en un frasco hermético (muestras Zn/PA-Dir y CuZn/PA-Dir). El proceso de síntesis de los compósitos se esquematiza en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema del procedimiento de síntesis de compósito HT/PA-Dir.

#### 2.2.4. Preparación de compósitos HT/PA-Mec

En un vaso de precipitado se dispersaron 0.9 g de la hidrotalcita en 50 mL de agua con agitación constante. Posteriormente se agregó 0.1 g de poliacrilato de sodio y se dejó en agitación constante por 3 horas. Pasado este tiempo, los sólidos se recuperaron por decantación y se guardaron sin secar en un frasco hermético (muestras Zn/PA-Mec y CuZn/PA-Mec). En la Figura 7 se esquematiza el proceso de síntesis de los compósitos.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento de síntesis de compósito HT/PA-Mec.

En la Tabla 8 se presentan las claves de las muestras y un resumen de las condiciones de preparación.

**Tabla 8.** Claves y resumen de las condiciones de preparación de las muestras.

Muestra	Composición	Relación molar	Método de impregnación
<b>Zn/PA-Con</b>	Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla con gel precursor de hidrotalcita y cristalización con ultrasonido
<b>Zn/PA-Ult</b>	Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla con gel precursor de hidrotalcita
<b>Zn/PA-Mec</b>	Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla mecánica
<b>Zn/PA-Dir</b>	Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Síntesis directa
<b>CuZn/PA-Con</b>	Cu/Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla con gel precursor de hidrotalcita y cristalización con ultrasonido
<b>CuZn/PA-Ult</b>	Cu/Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla con gel y cristalización con ultrasonido
<b>CuZn/PA-Mec</b>	Cu/Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Mezcla mecánica
<b>CuZn/PA-Dir</b>	Cu/Zn/Al/Poliacrilato de sodio	3:1	Síntesis directa

### 2.3. Materiales híbridos melanina-hidrotalcita

En este apartado se abordará la metodología de síntesis para la obtención de nuevos materiales híbridos constituidos por melanina e hidrotalcita de ZnAl y haloisita. Se presentarán algunos resultados de actividad contra *Trichophyton mentagrophytes* un hongo dermatofito asociado a infecciones dermatológicas.

### 2.3.1 Síntesis

En este apartado se describirán las condiciones experimentales de la técnica utilizada para sintetizar la hidrotalcita y los materiales híbridos y la técnica para evaluar la propiedad fungicida de las arcillas y los híbridos de melanina e hidrotalcita.

En la Tabla 9 se muestran los reactivos utilizados para la síntesis de la hidrotalcita.

**Tabla 9.** Reactivos empleados para la síntesis de la hidrotalcita y materiales híbridos.

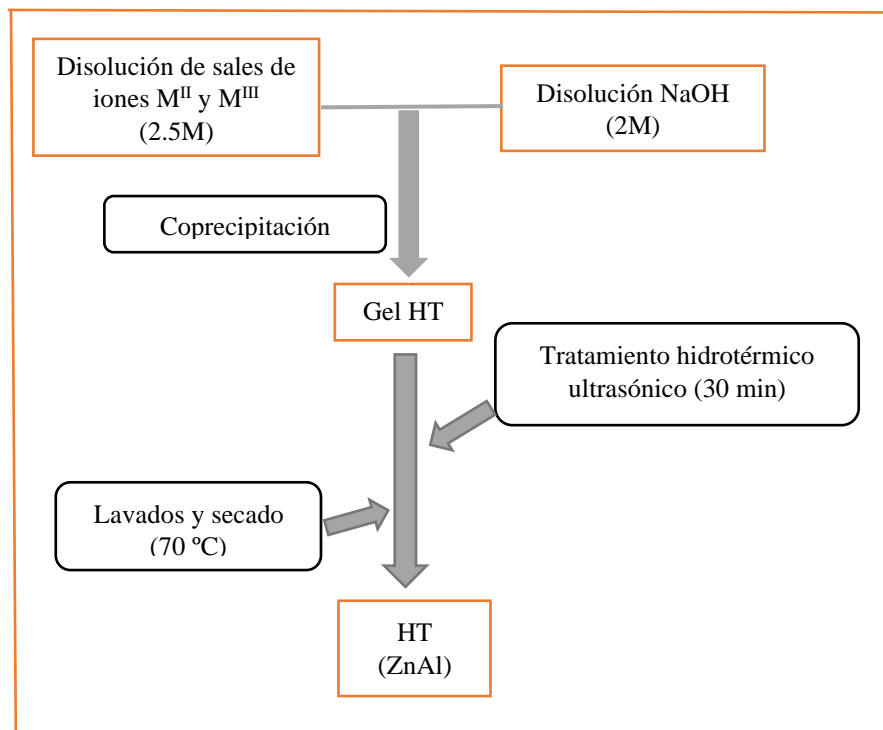
Reactivo	Masa Molar (g)	Pureza (%)	Marca
<b>Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	297.49	98	Sigma Aldrich
<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b>	375.13	98	Sigma Aldrich
<b>NaOH</b>	40	99	Sigma Aldrich

#### 2.3.1.1. Haloisita natural

Haloisita natural fue obtenida de Sigma-Aldrich. Está compuesta por nanotubos de aluminosilicatos de fórmula: Al<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (OH)<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

### 2.3.2. Síntesis de la hidrotalcita

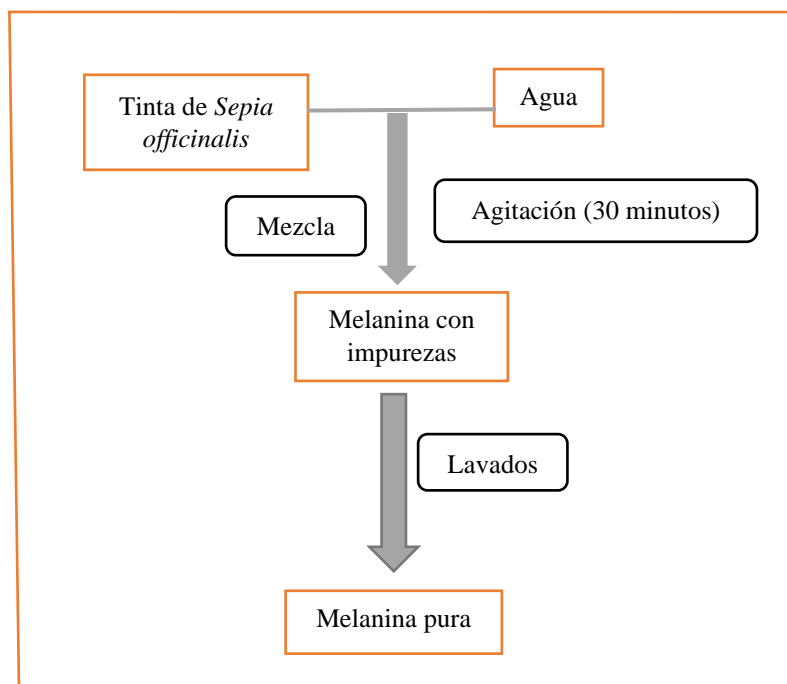
La hidrotalcita de composición Zn/Al y relación molar M<sup>2+</sup>/M<sup>3+</sup> de 3:1 se preparó por el método de síntesis simultánea asistida con ultrasonido como se describió en el apartado 3.1. En la Figura 8 se muestra el procedimiento de síntesis de la hidrotalcita.



**Figura 8.** Esquema del procedimiento de síntesis de la hidrotalcita.

### 2.3.3. Obtención de melanina

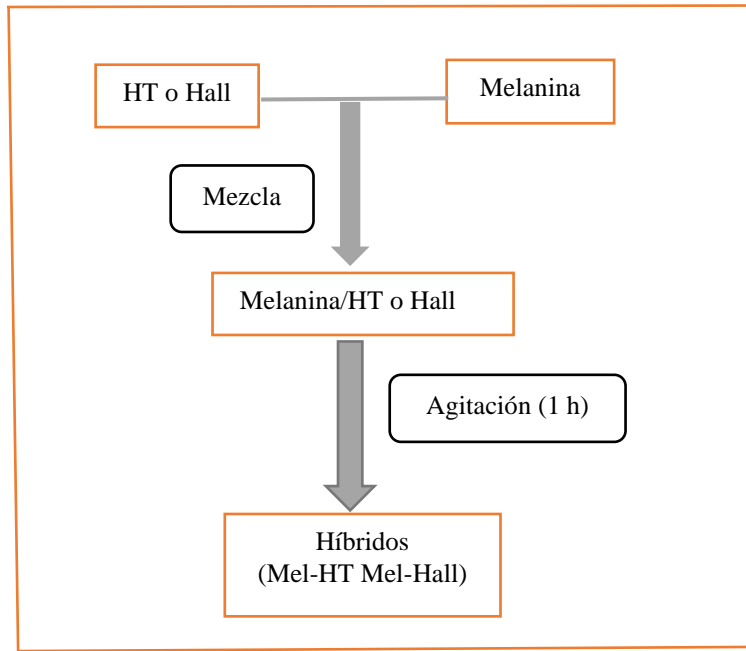
La melanina natural se extrajo siguiendo un procedimiento modificado descrito por Liu y Simon (2003), a partir de una tinta comercial refrigerada de *Sepia officinalis*. Se usó agua desionizada para diluir 20 mL de tinta a 500 mL sobre agitación magnética durante 30 minutos. La tinta se centrifugó en un equipo Labnet Hermle Z300 a 6000 rpm durante 15 minutos y luego se eliminó el sobrenadante. Los sólidos precipitados formaron una masa viscosa y fueron re-suspendidos en 500 mL de agua desionizada para ser finalmente centrifugada a 6000 rpm. Tal procedimiento de lavado se repitió seis veces para asegurar la obtención de melanina pura (muestra Mel) la cual se almacenó en forma húmeda. El procedimiento de síntesis de melanina se esquematiza en la Figura 9.



**Figura 9.** Esquema del método de obtención de melanina.

#### **2.3.4. Procedimiento de síntesis de los materiales híbridos hidrotalcita y haloisita con melanina**

Se dispersó 1 g de hidrotalcita ZnAl (muestra HT) o haloisita (muestra Hall) en 300 mL de agua desionizada en agitación constante. Después, se añadieron 500  $\mu$ L de solución de melanina, obtenida como se describió anteriormente, a las suspensiones sólidas y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Los sólidos se recuperaron por decantación para finalmente ser secados a 70 ° C por 24 h en una estufa. El híbrido melanina-hidrotalcita se designó como Mel-HT y el híbrido melanina-haloisita Mel-Hall. La Figura 10 muestra el procedimiento de síntesis de los híbridos. En la Tabla 10 se reportan los materiales híbridos sintetizados.



**Figura 10.** Procedimiento de síntesis de los híbridos melanina/hidrotalcita y melanina/haloisita.

**Tabla 10.** Características de los materiales híbridos sintetizados.

Muestra	Composición	Método de impregnación
Mel-HT	Zn/Al/ Melanina	Convencional
Mel-Hall	Zn/Al/Halloysita	Convencional

## 2.4. Métodos de caracterización

Las muestras sintetizadas se caracterizaron mediante diversas técnicas analíticas como son: difracción de rayos X (DRX), espectroscopia de infrarrojo (FTIR), adsorción-desorción de nitrógeno y microscopia electrónica de barrido (MEB). En el siguiente apartado se describen de manera general las técnicas empleadas, así como las condiciones experimentales bajo las cuales los equipos fueron operados para llevar a cabo la caracterización de cada uno de los materiales.

#### **2.4.1. Difracción de rayos X**

Este análisis permite calcular el valor de las distancias interlaminares utilizando la ley de Bragg ( $n\lambda=2d\text{sen}\theta$ ). Los análisis de difracción de rayos X se realizaron con un difractómetro para polvos Bruker modelo D8 Discover equipado con un detector de tipo LynxEye.

#### **2.4.2. Espectroscopia de infrarrojo**

Las bandas de adsorción de los grupos funcionales característicos de los materiales se identificaron en un equipo Digilab Excalibur FTS 3000 con un rango de escaneo de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Los análisis se realizaron con pastillas compactadas compuestas por 1 mg de la muestra con 29 mg de KBr.

#### **2.4.3. Fisisorción de nitrógeno**

Las áreas específicas BET y la distribución de tamaño de poros de los materiales orgánicos e inorgánicos se realizaron en un equipo Micromeritics ASAP 2020. Se pretrataron aproximadamente 0.2 g de material a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h y  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 8 h a un vacío de  $30\text{ }\mu\text{mHg}$ . Después del pretratamiento, el material se evaluó en intervalos de presión relativa de  $P/P_0$  entre 0.0005 y 0.99 a una presión de desgasificación  $5\text{ }\mu\text{mHg}$ . Las distribuciones de tamaños de poro se determinaron mediante el modelo BJH.

#### **2.4.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

La morfología de la superficie, las composiciones químicas y las imágenes de mapeo químico fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido. Las imágenes se obtuvieron bajo un microscopio Tescan, modelo Mira 3, que opera a 20 kV.

#### **2.5. Cepa bacteriana de referencia**

La cepa bacteriana utilizada en el ensayo fue la *Corinebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871).

### **2.5.1. Evaluación de la actividad bactericida de los materiales**

La actividad bactericida de las hidrotalcitas se evaluó por el método modificado de Kirby Bauer [Sacsquispe y Velázquez., 2002] en pozo como lo reportado por [Lobo-Sánchez y col., 2018], para obtener la concentración mínima a la cual inhibe a la bacteria. Se sembró en medio Muller-Hilton la cepa *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871) y se incorporaron diferentes hidrotalcitas. Los compósitos fueron agregados de igual manera. Las hidrotalcitas fueron probadas con 30, 50, 100 y 150 mg/mL, los compósitos fueron probados con 30, 50 y 100 mg/mL. Después, las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C por 24 h [Jiménez -Galiseo, 2015]. Pasadas las 24 h de incubación, las placas se examinaron visualmente para determinar los halos de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **2.5.2. Construcción de correlación de UFC vs DO de *Corynebacterium ammoniagenes***

El parámetro de células viables de *Corynebacterium ammoniagenes* en caldo de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) se evaluó con la construcción de una curva de crecimiento usando el método de diluciones y vertido en placa. Para el método de diluciones seriadas se inoculó la cepa *Corynebacterium ammoniagenes* y se colocaron 120 µL de pre-inóculo en un matraz Erlenmeyer con 60 mL de caldo nutritivo BHI estéril. El inóculo se colocó en una incubadora orbital a 37 °C bajo agitación continua a 110 rpm. El cultivo se monitoreó cada media hora durante las tres primeras horas, y posteriormente a cada hora hasta el tiempo final de 7 h. Se empleó un espectrofotómetro UV/Vis (Velab, modelo VE-5600UV) para determinar la densidad óptica (DO) a 625 nm como lo reportó [León-Vallejo, 2018]. Esto se hizo hasta determinar la fase del crecimiento exponencial del microorganismo. Para el conteo en placa se realizó el procedimiento de vertido en placa [Pimentel y col.,2016], por lo cual a cada hora se realizaron diluciones seriadas de base 10 (de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ ) del inóculo en caldo nutriente BHI, por lo que se transfirió 1 mL a un tubo con 9 mL de caldo nutriente para obtener una primera dilución; por cada dilución se colocó 1 mL de la disolución a la caja Petri grande. Posteriormente se realizó el vertido en placa, donde se agregaron a las cajas Petri alrededor de 20 mL de agar BHI y con movimientos suaves se homogenizaron. Las placas se dejaron gelificar y se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 24 h bajo condiciones aerobias. Después del tiempo de incubación se cuantificaron las colonias formadas en cada placa empleando un equipo contador de colonias (Q-20).

### **2.5.3. Evaluación de la actividad fungicida del material híbrido**

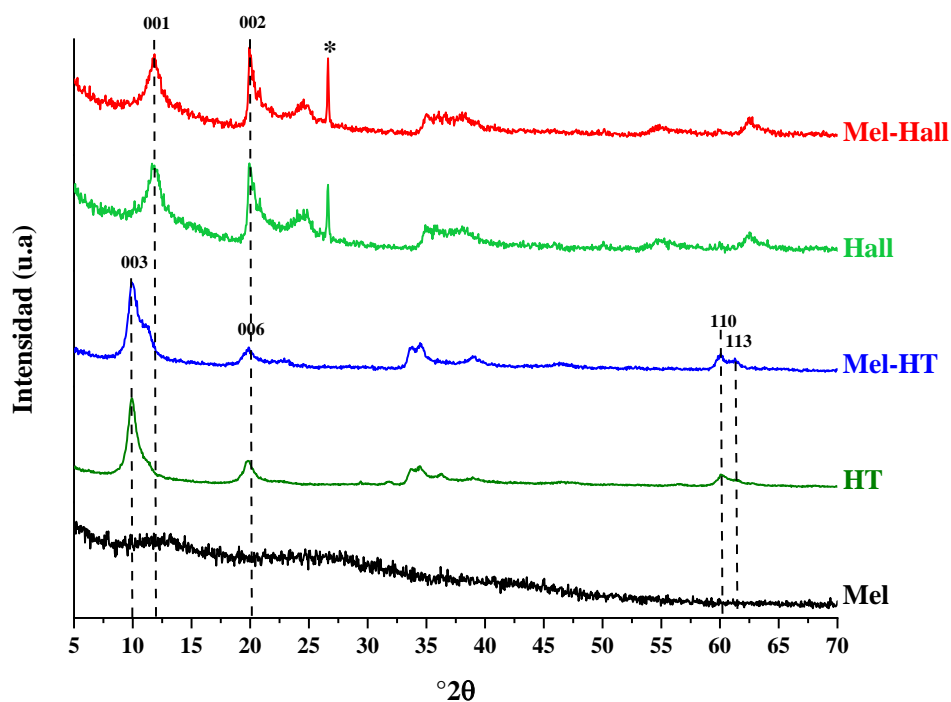
Se realizaron pruebas antimicóticas en aislado clínico CFQ-H-157 de *Trichophyton mentagrophytes van indergitabile* que se obtuvo en CFQ-UNAM, México. El hongo se mantuvo rutinariamente en agar de papa zanahoria (PCA). Las arcillas se disolvieron en etanol absoluto para preparar soluciones madre concentradas para la posterior evaluación antifúngica. Para los ensayos de dilución de agar, se ajustaron directamente diferentes concentraciones de arcilla (0.5-10 mg mL<sup>-1</sup>) en placas Petri estériles que contenían 10 mL de medio PCA (Griffin et al., 2000). Se inoculó una solución de 100 artrosporas de *T. mentagrophytes* en medio PCA. Las mezclas se incubaron a 28 °C durante 5 días. Cada concentración se analizó por quintuplicado dos veces (n = 10). Los ensayos de microdilución de caldo XTT (0.5-10 mg mL<sup>-1</sup>) se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el mismo número de artrosporas que para el método de dilución de agar de acuerdo con Loures y Levits (2015) en un volumen final de 0.3 mL en quintuplicado tres veces (n = 15). Los valores de las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) se determinaron mediante la prueba ANOVA-Tukey (p <0.01) utilizando el software GraphPad Prism 7.02.

### 3. CAPITULO TRES: RESULTADOS

#### 3.1. Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X de la melanina, hidrotalcita y el híbrido melanina-hidrotalcita se muestran en la Figura 13. El patrón de difracción de la melanina no muestra ningún pico, lo que confirma el carácter amorfo de este compuesto. En cambio, las arcillas son cristalinas. La hidrotalcita se identificó con la tarjeta JCPDS 014-0191. Para la muestra HT se encontró una distancia interlaminar ( $d_{003}$ ) de 8.6 Å. Esta distancia se atribuye a la coexistencia de aniones nitratos y carbonatos entre las láminas [Duan y col., 2006]. Los picos correspondientes a los planos (110) y (113) están bien definidos, lo que indica un alto arreglo de disposición de los cationes metálicos en las láminas de la hidrotalcita [Bergadà y col., 2007].

Cuando se integró la melanina (muestra Mel-HT), el patrón de rayos X reproduce el de la hidrotalcita, con la diferencia de que el pico (003) presenta un ligero hombro y podría corresponder a una segregación de aniones, probablemente causada por la obstrucción de la movilidad de los aniones, [Velázquez-Herrera y col., 2020]. La presencia de melanina en la muestra Mel-HT no puede ser percibida por esta técnica, probablemente debido a la pequeña cantidad de melanina y/o a los pequeños tamaños de las moléculas que no pueden ser reconocidas por la técnica de DRX, como también informaron Sommer y col., (2013), en el caso de clorofila inmovilizada en hidrotalcitas, o hemoglobina retenida en hidrotalcitas por Netzahualcoyotzi y col., (2016). El patrón de difracción de la haloisita corresponde a una arcilla nano-tubular como describe Taroni y col., (2019) con los picos de difracción principales que aparecen en 11.8 y 19.9° ( $2\theta$ ) y corresponden a los planos 001 y 002, respectivamente [Sahnoun y col., 2016]. El pico que aparece a 26° ( $2\theta$ ) corresponde al cuarzo presente como impureza [Joussein y col., 2005] y comúnmente encontrado en arcillas naturales. Para la muestra que contiene melanina, Mel-Hall, el patrón de difracción de rayos X no detecta, como para la muestra Mel-HT, la presencia de melanina, probablemente debido a la misma razón explicada anteriormente.



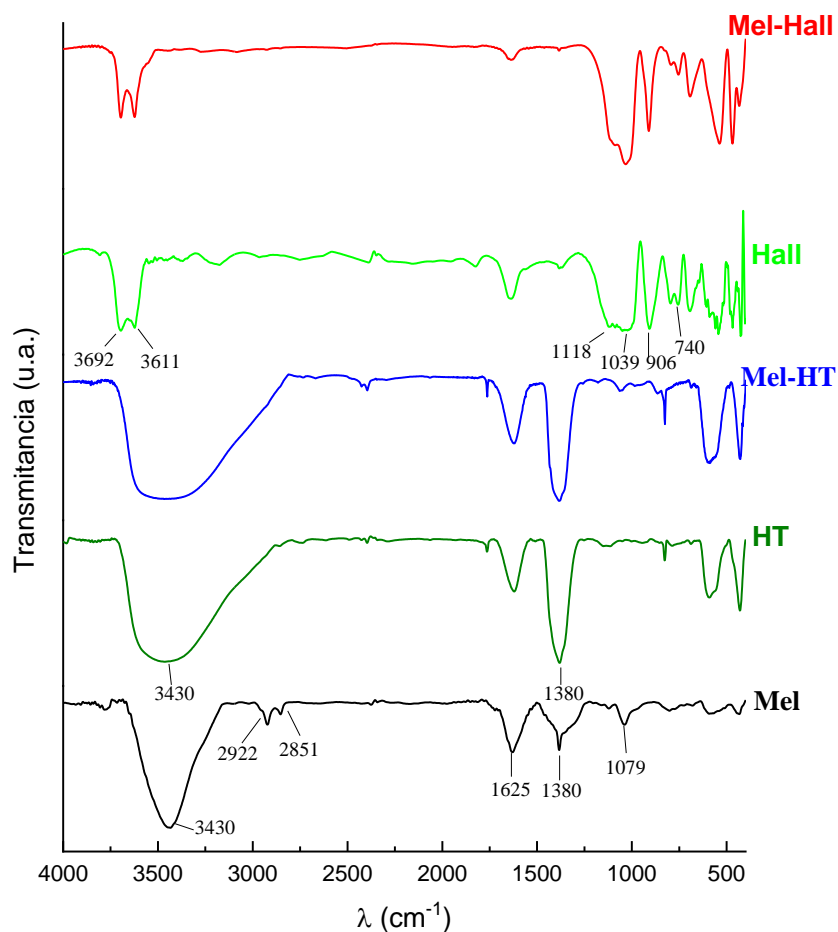
**Figura. 13.** Difractogramas de rayos X de la melanina (muestra Mel), hidrotalcita ZnAl (HT), haloisita (Hall) y los híbridos de melanina-arcillas (Mel-HT y Mel-Hall). \* Pico asignado al cuarzo presente como impureza.

### 3.2. Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 14 presenta los espectros FTIR de la melanina, la hidrotalcita y las muestras híbridas de melanina-hidrotalcita y melanina-haloisita. El espectro de la melanina muestra una banda intensa y ancha centrada en  $3430\text{ cm}^{-1}$  asignada a las vibraciones de estiramiento OH de los grupos catecol. La banda de doblete con mínimos en  $2922$  y  $2851\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones de estiramiento y flexión de C-H. La banda a  $1625\text{ cm}^{-1}$  es representativa de aromáticos C=C y grupos carboxilato, así como los heterociclos que contienen nitrógeno [Roy y Rhim, 2019, Costa y col., 2012; Wang y col., 2019; Kiran y col., 2014]. Las vibraciones de los grupos quinoneimina se reconocen a  $1380\text{ cm}^{-1}$ . La banda ancha centrada en  $1079\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones N-H [Wang y col., 2019]. Para la muestra Mel-HT, todas las bandas que se atribuyen a los principales grupos funcionales de la hidrotalcita se superponen a las de la melanina. La banda a  $3430\text{ cm}^{-1}$  es atribuida a las vibraciones de tensión de los grupos OH de las láminas y la banda a  $1625\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración de deformación angular originada por el grupo OH del agua interlamina. La banda con un

mínimo en  $1380\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la presencia de iones nitrato interlaminares [Rocha Oliveira y col.,2015]. Las bandas entre  $400$  y  $850\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos vibracionales de flexión de los grupos Al-O y Zn-O según lo informado por Kloprogge y col. 2004.

Con respecto a la haloisita (Hall), su espectro FTIR muestra las bandas características en  $3692$ ,  $3611$  y  $906\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen a la vibración de los enlaces Al-OH. Las señales a  $1118$ ,  $1039$  y  $740\text{ cm}^{-1}$  se asignan a las vibraciones del enlace Si-O [Alam y col., 2020]. Para la muestra híbrida Mel-Hall, existe una superposición de las bandas de ambos componentes, no siendo posible apreciar la presencia de melanina en este material.



**Figura 14.** Espectros de infrarrojo de la muestra melanina (Mel), hidrotalcita ZnAl (HT), haloisita (Hall) y los híbridos melanina-arcillas (Mel-HT y Mel-Hall).

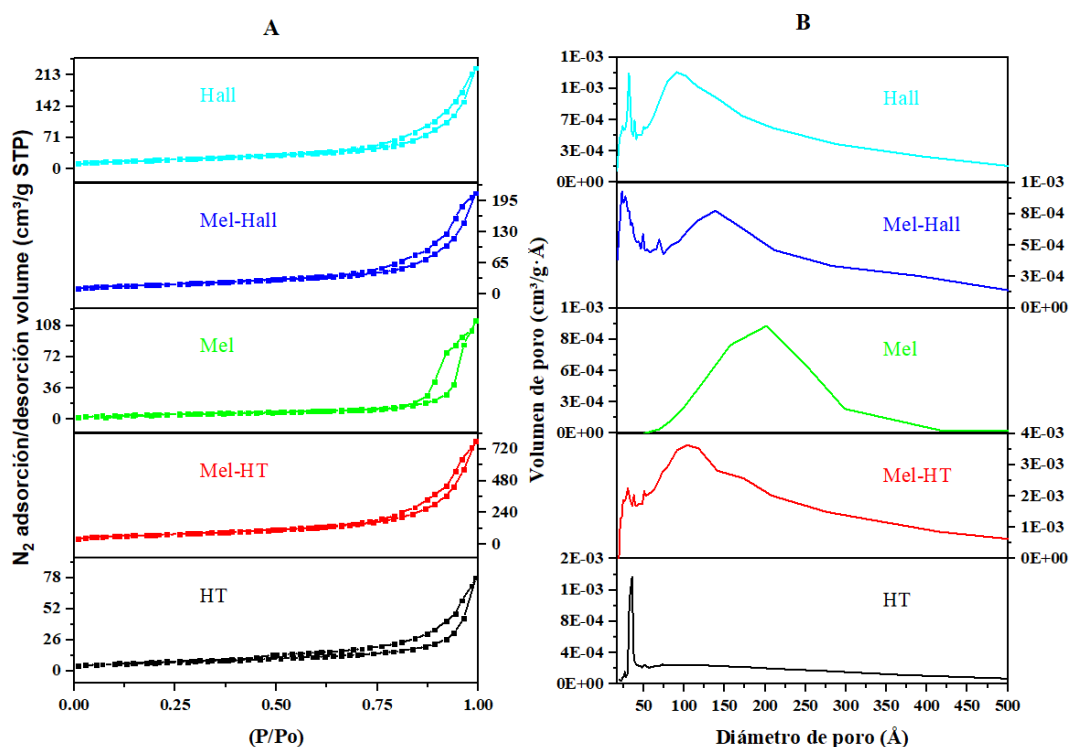
### 3.3. Fisisorción de nitrógeno

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno y la distribución de diámetro de poros de las muestras HT, Hall, Mel-HT y Mel-Hall se muestran en la Figura 15. La isoterma de la muestra HT es representada por una isoterma Tipo IV, característica de este tipo de arcilla. Esta isoterma se caracteriza por sólidos adsorbentes mesoporosos con un lazo de histéresis del tipo H3, representativo de materiales con poros en forma de hendidura. El perfil de la muestra de Hall también refleja las características de las isothermas de Tipo IV, por lo que posee predominio de mesoporos, como también lo demuestra el ciclo de histéresis correspondiente al tipo H3 [Szczepanik y col., 2017; Li y col., 2018]. Para la melanina, se reconoció una isoterma del Tipo II, con un ciclo de histéresis de tipo H4, atribuido a meso y macroporos formados por la aglomeración de partículas esféricas con tamaños casi uniformes [Liu y Simon, 2003].

Las curvas de adsorción-desorción de nitrógeno de los materiales híbridos presentan perfiles similares de las arcillas, a la diferencia de que los ciclos de histéresis comienzan a presiones relativas más altas. Por lo tanto, el comportamiento de adsorción está influenciado por el componente melanina. Dichas observaciones están de acuerdo con las distribuciones de tamaño de poro correspondientes, Figura 15B. La hidrotalcita y la haloisita mostraron dos máximos: uno estrecho centrado a 30 Å y otro ancho entre 60 Å y 300 Å y centrado a 100 Å, mientras que la melanina presentó solo un máximo centrado a 200 Å, en el rango de 100 a 400 Å. Esto indica que la melanina tiene poros más grandes que los de las arcillas. La distribución de tamaño de poro de los materiales híbridos también tiene características similares de las muestras cristalinas a diferencia de que la curva es más intensa para los poros en la región de 300 a 600 Å, indicando que su presencia modifica la textura de los materiales inorgánicos. Las áreas específicas de la hidrotalcita y la haloisita fueron de 23.0 m<sup>2</sup>/g y 70.1 m<sup>2</sup>/g, respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por otros autores para hidrotalcitas que contienen nitratos intercalados y para la haloisita Sigma-Aldrich [Taroni y col., 2019; Sampieri y col., 2007; Joussein y col., 2005].

Para los materiales híbridos, se puede apreciar que la adición de melanina no modifica significativamente las áreas específicas; para la hidrotalcita se produce un pequeño aumento, mientras que ligera disminución ocurre para la haloisita. Estos resultados muestran que la melanina no interfiere significativamente en las áreas superficiales de los materiales

originales. La melanina no está formada por partículas tan pequeñas como para entrar en los poros de la haloisita ni para ocupar los espacios interlaminares de la hidrotalcita. El área de superficie de la melanina natural fue de 18.8 m<sup>2</sup>/g, aunque algunos autores han reportado áreas cercanas a cero [Park y col., 2020]. Para explicar esta área relativamente alta, las moléculas de melanina deben aglomerarse, formando bloques o partículas similares a las del acrilato en el poliacrilato, originando porosidad entre las cadenas enredadas de melanina.

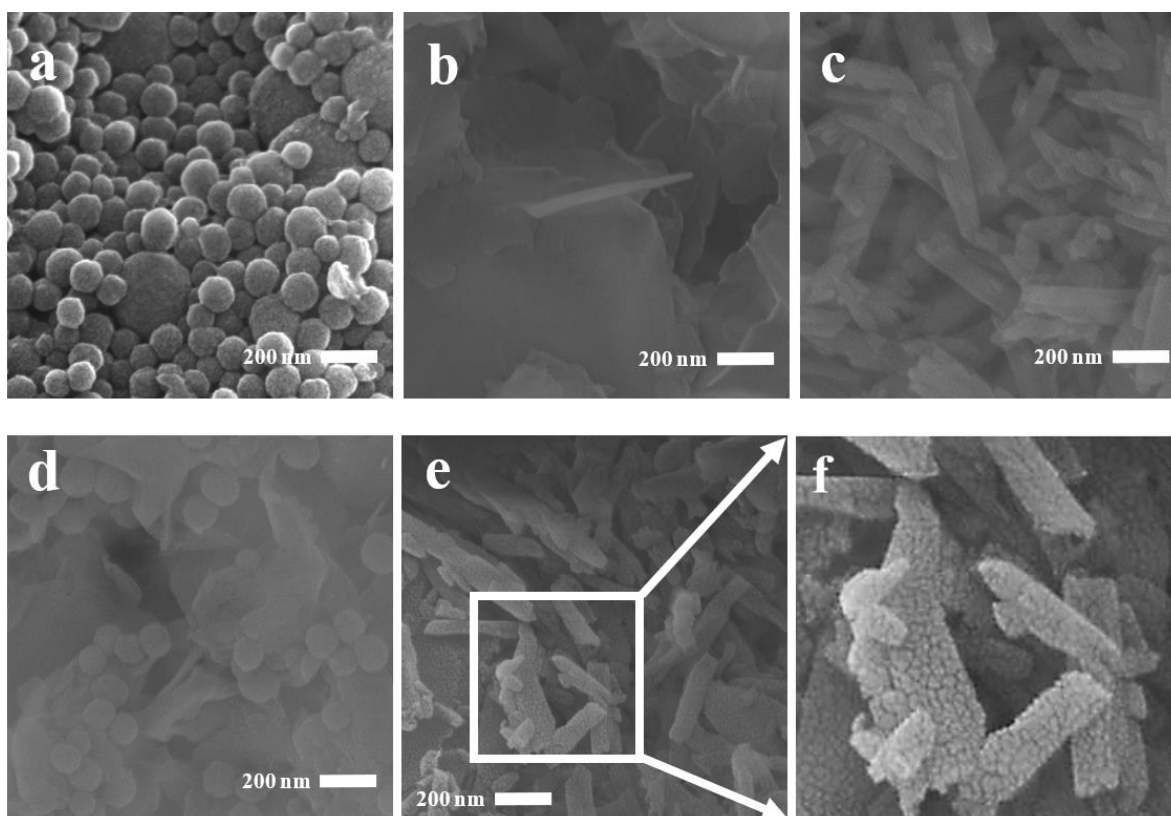


**Figura 15.** A) Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno y B) Distribuciones de tamaños de poros de la melanina, arcillas y materiales híbridos.

### 3.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las micrografías de la hidrotalcita, melanina e híbridos melanina-hidrotalcita y melanina-haloisita se muestran en la Figura 16. Se puede apreciar que la melanina está formada por aglomerados en forma de esférulas con tamaños que varían entre 30 y 90 nm, con un tamaño promedio de 60 nm. La morfología de la muestra HT (Figura 16b) muestra un arreglo en forma de hojuelas de aproximadamente 500 nm de diámetro y 30 nm de espesor, típico de los materiales laminares como las arcillas [Velázquez-Herrera y col., 2018]. La muestra de haloisita está formada por nanotubos de aproximadamente 500 nm de largo y 70

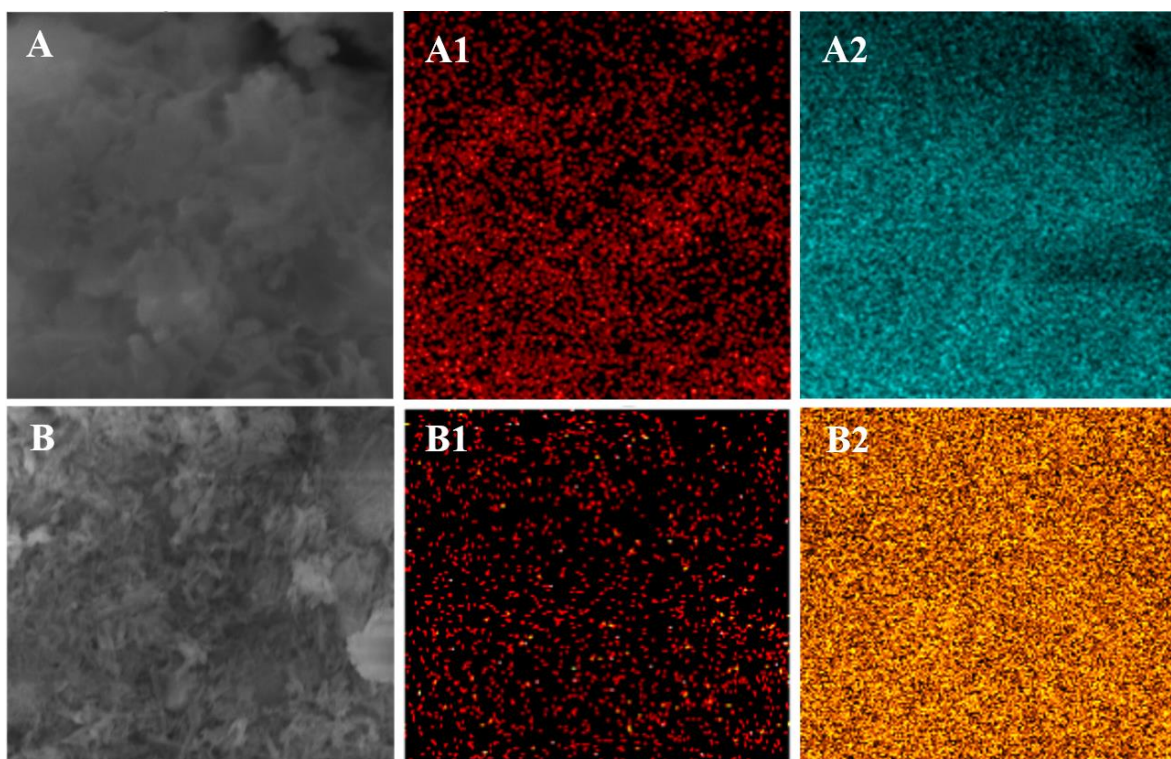
nm de diámetro (Figura 16c). Para el híbrido Mel-HT (Figura 16d) se observa una distribución homogénea de las esférulas de melanina entre las nano-láminas de hidrotalcita. No se distinguen muchas modificaciones en los tamaños de los dos componentes. Ambos compuestos se encuentran íntimamente mezclados, pero debido a la forma esférica de la melanina la interacción superficial entre ambos componentes puede resultar baja. En cambio, para la muestra de Mel-Hall (Figura 16e), la melanina se encuentra en forma de aglomerados muy pequeños (aproximadamente 10-15 nm) cubriendo las superficies externas de los nanotubos de haloisita. Este tipo de disposición de la melanina se puede observar claramente en la Figura 16f. Para esta arcilla híbrida, la interacción de ambos componentes puede ser ideal, teniendo en cuenta que existe una grande superficie de contacto entre los componentes.



**Figura 16.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las muestras con un aumento de 200,000 X: a) Mel, b) HT, c) Hall, d) Mel-HT; e) Mel-Hall y f) imagen aproximada de una parte de la muestra Mel-Hall.

La Figura 17 muestra el mapeo o las distribuciones elementales de los componentes en los materiales. La melanina se identifica por el carbono, la hidrotalcita se reconoce por el

zinc y la haloisita por el silicio. En la muestra Mel-HT, la concentración de carbono aparece como aglomerados circulares mayores que los de melanina en la muestra Mel-Hall con una distribución menos homogénea. Los mapeos de zinc en la hidrotalcita y el silicio en la haloisita indican que estos elementos se dispersan de manera homogénea, de acuerdo con sus estructuras cristalinas.



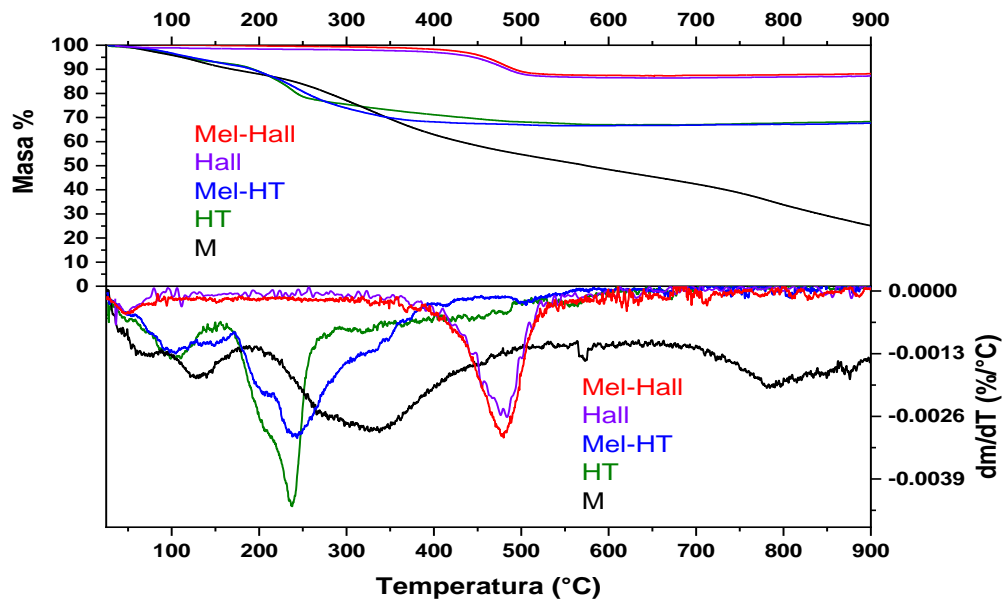
**Figura 17.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de: A) híbrido melanina-hidrotalcita (muestra Mel-HT) con un aumento de 5,000 X y mapeos elementales de A1) carbono y A2) zinc; B) melanina-haloisita híbrida (muestra Mel-Hall) con un aumento de 5,000 X y mapeos elementales de B1) carbono y B2) silicio.

### 3.5. Análisis termogravimétrico

Las pérdidas de masa de los materiales se analizaron mediante TGA/DTA, cuyas curvas se presentan en la Figura 18. Los perfiles de pérdida de masa de ambos materiales híbridos fueron muy similares a los de las arcillas. Para la muestra HT, una pérdida de masa del 10%, correspondiente al agua adsorbida, se liberó de 25 a 180 °C, como lo muestra el perfil TG con un punto medio máximo a 120 °C mostrado por la curva  $dm/dT$ . Una segunda

pérdida de masa del 15%, de 180 a 480 °C, con un punto medio a 240 °C, puede atribuirse a la deshidroxilación y la descomposición aniónica entre capas [Roelofs y col., 2002], y un tercer intervalo de 4%, entre 480 y 600 °C, correspondiente a la destrucción total de la estructura de la hidrotalcita y formación de compuestos de ZnO y ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. La muestra híbrida Mel-HT difiere de la HT solo en la temperatura del segundo intervalo, que se extiende a temperaturas más altas, hasta 520 °C, debido a la descomposición de la melanina, la deshidroxilación y la desintegración de aniones. Sin embargo, la melanina integrada a la hidrotalcita se descompone mucho más fácilmente en comparación con la melanina sola como lo muestran las curvas TG y dm/dT, teniendo en cuenta que la melanina no se descompone completamente a 900 °C. Tal diferencia podría atribuirse a la baja cantidad de melanina presente en el material híbrido, teniendo en cuenta que, en este caso, el oxígeno tiene fácil acceso a las partículas de melanina.

Con respecto a las muestras Hall y Mel-Hall, los perfiles TG son muy similares. Una pérdida de masa de aproximadamente 2% a temperaturas entre 25 y 100-150 °C se atribuye a la desorción de agua de los nanotubos, y una segunda pérdida de masa de aproximadamente 14% de 400 a 600 °C, con un máximo en la curva dm/dT a 480 °C, es debido al proceso de deshidroxilación, que conduce a una degradación estructural de la arcilla [Kang y col., 2017; Falcón y col., 2015]. En el caso de la muestra Mel-Hall, la descomposición de la melanina casi no se diferencia de la muestra de Hall, probablemente debido a la muy baja cantidad y a la muy alta dispersión de las partículas, proporcionando su descomposición en los mismos momentos del material huésped.



**Figura 18.** Perfiles TGA y DTA de las muestras de melanina (Mel), arcillas (HT y Hall) e híbridas (Mel-HT y Mel-Hall).

### 3.6. Evaluación antimicrobiana

#### 3.6.1 Bactericidas

Para la evaluación bactericida se probaron los híbridos de poliacrilato de sodio e hidrotalcitas de Zn/Al.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de la hidrotalcita se llevó a cabo por el método modificado Kirby Bauer de difusión en pozo contra la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC 6871). Las hidrotalcitas fueron previamente trituradas para una mejor homogenización. En la Tabla 9 se reportan los halos de inhibición, en mm de espesor, para la cepa Gram positiva *Corynebacterium ammoniagenes a* concentraciones de 10, 30, 50, 100 y 150 mg de hidrotalcita por mL y de los compósitos a concentraciones de 30, 50 y 100 mg/mL. Se midieron los halos de inhibición después de 24 horas de incubación.

**Tabla 11.** Espesor de los halos de inhibición (en mm) para las diferentes hidrotalcitas y compósitos a diferentes concentraciones.

Muestra	Concentración mg/mL				
	10	30	50	100	150
<b>Zn/Al 4</b>	1.0 ± 0.25	1.0 ± 0.30	2.0 ± 0.26	2.0 ± 0.36	3.0 ± 0.43
<b>Zn/Al 3</b>	1.0 ± 0.30	3.0 ± 0.41	4.0 ± 0.35	5.0 ± 0.47	5.0 ± 0.41
<b>Zn/Al 2</b>	0	0	0	1±0.41	0
<b>CuZn/Al 4</b>	0	0	1.0 ± 0.1	0	1.0 ± 0.35
<b>CuZn/Al 3</b>	0	1.0 ± 0.36	1.0 ± 0.20	2.0 ± 0.40	3.0 ± 0.44
<b>CuZn/Al 2</b>	0	0	1.0 ± 0.25	1.0 ± 0.26	2.0 ± 0.2
<b>Zn/Pa-Ult</b>	0	0	4.0 ± 0.30	5.0 ± 0.53	0
<b>Zn/Pa-Con</b>	0	0	3.0 ± 0.74	4.0 ± 0.38	0

A partir de los datos de la Tabla 11 se puede inferir que a una concentración de hidrotalcita de 10 mg/mL solo las muestras Zn/Al 4 y Zn/Al 3 resultaron activas y con halos de inhibición de 1 mm de espesor. A medida que aumentan las concentraciones aumenta también las actividades de las muestras, dado que a una concentración de 150 mg/mL los halos llegan a valores de 5.0 mm, a excepción de la muestra Zn/Al 2 que no presentó actividad a esta concentración. Al considerar las relaciones molares, se observa que a relaciones de 2 no hay actividad a concentraciones menores de 50 y 100 mg/mL. Además, a estas concentraciones, donde la actividad se hace presente, los halos de inhibición son de apenas 1 mm, representando una baja actividad. A relaciones molares de 4 se evidencia la mejor actividad de la muestra Zn/Al con relación a la de CuZn/Al, en donde la primera presenta actividad desde 10 mg/mL, mientras que la segunda solo a 50 y 150 mg/mL. La relación molar 3 se ve favorable entre las tres relaciones estudiadas, dado que fueron las más efectivas con halos de 5 y 3 mm para las composiciones de Zn/Al y CuZn/Al, respectivamente. Al comparar los datos referentes a las composiciones de los compósitos se infiere que los de Zn/Al resultaron más efectivos que los de CuZn/Al y a cualquier composición.

Con estos resultados se puede concluir que la hidrotalcita que mejor cumple con los requerimientos de actividad contra la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* es el Zn/Al a una relación molar de 3.

Es evidente que el cobre presente en estos materiales no es tan activo como el zinc para combatir este tipo de bacteria. Estos resultados están en acuerdo con los reportados por León-Vallejo y col., (2019) al que la mejor actividad de las hidrotalcitas de zinc se atribuye a una menor estabilidad térmica y química y, en consecuencia, una fácil liberación del zinc de la estructura para interactuar con las bacterias. Referente a la concentración de zinc, cabe mencionar que, a bajas concentraciones, como en la muestra Zn/Al 2, el Zn se involucra en los aspectos de crecimiento microbiano, metabolismo y diferenciación [Ehrlich, 1997]. A altas concentraciones, como en las muestras Zn/Al 3 y Zn/Al 4 el zinc que no pudo metabolizar la bacteria, es decir, el zinc en exceso es el causante del ataque a la bacteria en una especie de sobre dosis de este metal. Esto se corrobora con lo reportado en la literatura en que el Zn funciona como agente bactericida en altas concentraciones frente a varios tipos de microorganismos [Jansen y col., 1994; McDevitt y col., 2011; David, 2012].

A partir de estos resultados, en donde la hidrotalcita con mejor actividad microbiana fue la hidrotalcita de Zn/Al a una relación molar de 3, los compósitos se sintetizaron a una concentración de Zn/Al de 3. Para comparación, también se prepararon muestras de hidrotalcita con CuZn/Al con la finalidad de ver si en medio de poliacrilato el cobre actuaría de modo más efectivo contra la bacteria estudiada. La concentración de los compósitos fue de 50 mg/mL, donde las hidrotalcitas solas resultaron con mejor actividad antimicrobiana y con mucha menor cantidad de muestra que a 150 mg/mL.

Conociendo que la hidrotalcita con mejor actividad microbiana fue la hidrotalcita de ZnAl a una relación molar de 3:1, los compósitos se sintetizaron con las hidrotalcitas ZnAl y CuZnAl a esa relación metálica molar (50 mg/mL) como base según la metodología ya descrita, para poder conocer su actividad antimicrobiana los compósitos se analizaron por el método modificado de difusión en pozo vs *Corynebacterium ammoniagenes*

Los resultados de las pruebas antimicrobianas mostraron que los halos de inhibición de los compósitos a una concentración de 50 mg/mL solo se presentan en las muestras Zn/PA-Con y Zn/PA-Ult, con halos de inhibición de 3 y 4 mm de espesor en forma circular. Las muestras Zn/PA-Mec, Zn/PA-Dir, CuZn/PA-Con, CuZn/PA-Ult, CuZn/PA-Mec y

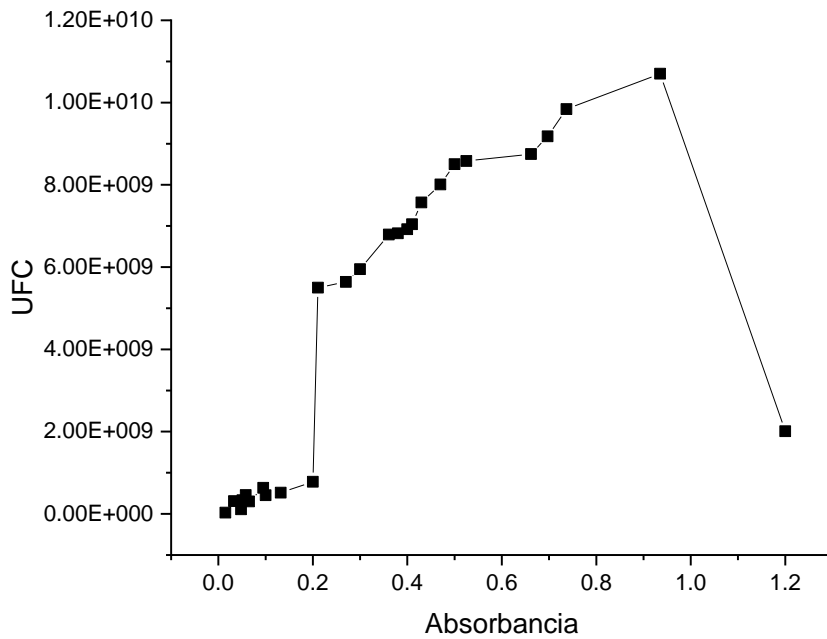
CuZn/PA-Dir no presentaron actividad bactericida contra la bacteria *Corinebacterium ammoniagenes*.

Estos resultados evidencian que la actividad depende de la composición de las hidrotalcitas y del método de síntesis. Referente a la composición, el cobre efectivamente no funciona como elemento bacteriostático contra la bacteria estudiada, confirmando así los resultados presentados anteriormente. Referente al método de preparación de los compósitos, los únicos convenientes fueron los empleados para las muestras Zn/PA-Con y Zn/PA-Ult, que son métodos muy similares; en uno el tratamiento fue con cristalización vía ultrasonido y, en el otro, vía procedimiento convencional.

### **3.6.1.1 Curva de correlación de UFC vs DO de *Corynebacterium ammoniagenes***

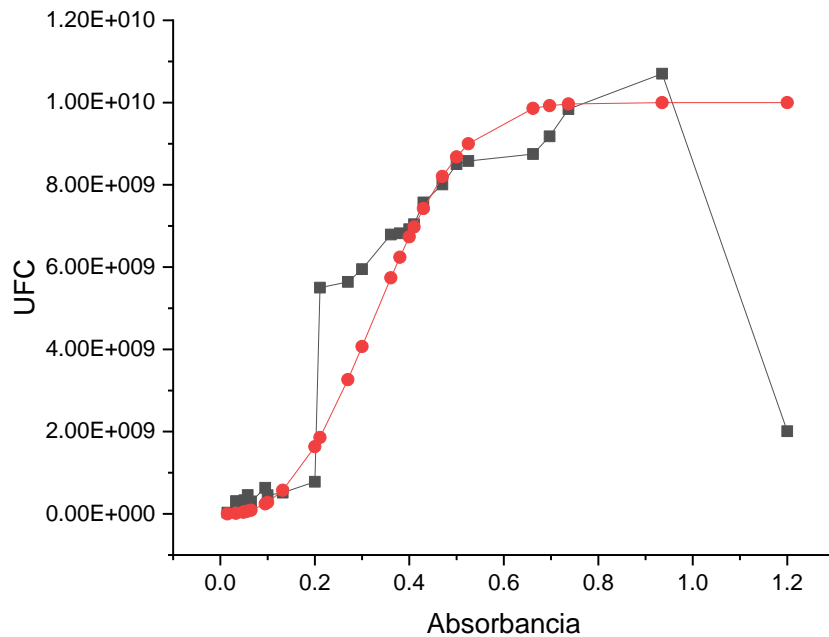
Para evaluar el número de microorganismos viables en la suspensión bacteriana se realizó una curva de crecimiento relacionando densidad óptica con el número de colonias de microorganismos totales viables, expresados como UFC/mL.

La curva de correlación de UFC vs DO de *Corynebacterium ammoniagenes* se muestra en la Figura 11 donde se representa la fase del crecimiento de la bacteria. Se observa que con una absorbancia de 0.015 empieza la fase de crecimiento exponencial, mientras que a partir de una absorbancia de 0.211 se empieza a presentar la fase estacionaria y se alcanza un máximo a una absorbancia de 0.935 para decaer a 1.200. Así, esta curva presenta un comportamiento logarítmico entre la concentración de células viables y la densidad óptica.



**Figura 11.** Curva de correlación de DO vs UFC de *Corynebacterium ammoniagenes*.

El crecimiento bacteriano a menudo muestra una fase en la que la tasa de crecimiento específica comienza en un valor de cero y luego acelera a un valor máximo en un cierto periodo de tiempo y posteriormente, corresponde a un tiempo de retraso. En estas condiciones, la curva de crecimiento se define como el logaritmo del número de organismos trazados contra el tiempo; estos cambios en la tasa de crecimiento dan como resultado una curva sigmoidea [Zwietering y col, 1990]. En la Figura 12 se presenta el ajuste de la curva de crecimiento usando el modelo Gompertz, el cual describe la cantidad de organismos o el logaritmo de organismos en función del tiempo.



**Figura 12.** Curva de correlación de DO vs UFC de *Corynebacterium ammoniagenes* ajustada al método de Gompertz.

### 3.6.1.2 Conclusiones parciales

- Se propuso la síntesis de compósitos hidrotalcita/poliacrilato de sodio mediante 4 métodos: mezcla mecánica de hidrotalcita con poliacrilato de sodio, síntesis directa de hidrotalcita sobre poliacrilato de sodio, mezcla con gel precursor de hidrotalcita con cristalización vía ultrasonido y mezcla con gel precursor de hidrotalcita de forma convencional.
- Los resultados antimicrobianos mostraron que la actividad frente a la bacteria *Corinebacterium ammoniagenes* dependió de las composiciones de las hidrotalcitas y de los procedimientos de preparación de los compósitos.
- Las hidrotalcitas de ZnAl presentaron mejor actividad antimicrobiana inhibitoria ante la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* que las hidrotalcitas CuZnAl.
- Los resultados antimicrobianos de los compósitos ante *Corynebacterium ammoniagenes* mostraron que los compósitos que contienen cobre no inhiben el crecimiento ni eliminan la bacteria a las concentraciones estudiadas.

- Los compósitos constituidos por la hidrotalcita de ZnAl sintetizados por ultrasonido presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra la bacteria *Corynebacterium ammoniagenes* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 mg/mL.

### 3.6.2. Fungicidas

Se realizaron pruebas antimicóticas en aislado clínico CFQ-H-157 de *Trichophyton mentagrophytes van indergitabile* que se obtuvo en CFQ-UNAM, México. El hongo se mantuvo rutinariamente en agar de papa zanahoria (PCA). Las arcillas se disolvieron en etanol absoluto para preparar soluciones madre concentradas para la posterior evaluación antifúngica. Para los ensayos de dilución de agar, se ajustaron directamente diferentes concentraciones de arcilla (0.5-10 mg mL<sup>-1</sup>) en placas Petri estériles que contenían 10 mL de medio PCA (Griffin et al., 2000). Se inoculó una solución de 100 artrosporas de *T. mentagrophytes* en medio PCA. Las mezclas se incubaron a 28 °C durante 5 días. Cada concentración se analizó por quintuplicado dos veces (n = 10). Los ensayos de microdilución de caldo XTT (0.5-10 mg mL<sup>-1</sup>) se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando el mismo número de artrosporas que para el método de dilución de agar de acuerdo con Loures y Levits (2015) en un volumen final de 0.3 mL en quintuplicado tres veces (n = 15). Los valores de las concentraciones mínimas de inhibición (CMI) se determinaron mediante la prueba ANOVA-Tukey (p <0.01) utilizando el software GraphPad Prism 7.02.

La Tabla 12 muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las muestras vs el crecimiento del hongo *Trichophyton mentagrophytes*. No se encontraron efectos inhibitorios para la melanina pura (muestra Mel) o haloisita (muestra Hall). La muestra de hidrotalcita (HT) presentó un valor de CMI de 7.5 y disminuyó a 3.9 mg mL<sup>-1</sup> con la adición de melanina. Esto indica que la melanina contribuye a la eficiencia de la arcilla. Más notable es la contribución de la melanina al material de haloisita, ya que la arcilla sola pasa de la inactividad al híbrido con la mejor actividad con un valor CMI de aprox. 2.3 mg mL<sup>-1</sup>. Estos resultados fueron corroborados por dos métodos antimicóticos independientes y están de acuerdo con la hipótesis inicial de que la melanina podría aumentar la actividad antifúngica de las arcillas.

**Tabla 12.** Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los materiales en *Trichophyton mentagrophytes* determinadas por dos métodos: dilución en agar y antimicóticos 2,3-bis- (2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil) - (2H) -tetrazolio-5-carboxanilida (XTT).

Muestra	CMI-AD (mg mL <sup>-1</sup> )	CMI-XTT (mg mL <sup>-1</sup> )
<b>Mel</b>	-	-
<b>Hall</b>	-	-
<b>HT</b>	7.5 ± 0.83 <sup>a</sup>	7.2 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>Mel-HT</b>	4.0 ± 0.22 <sup>b</sup>	3.7 ± 0.03 <sup>b</sup>
<b>Mel-Hall</b>	2.5 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.9 ± 0.01 <sup>c</sup>

El guion indica que no hay efecto a 8 mg mL<sup>-1</sup>. CMI-AD = concentraciones obtenidas por el método de difusión en agar. CMI-XTT = concentraciones obtenidas por el método XTT. Las medias con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en  $p < 0.01$  por Prueba de Tukey-ANOVA.

Las hidrotalcitas pueden alojar las moléculas de melanina en forma de esferoides con tamaños de 30-90 nm de diámetro que se ubican entre los bloques de folículos de hidrotalcita, mientras que con la haloisita la melanina se dispersa en capas delgadas, cubriendo totalmente las superficies externas de los nanotubos. Estas diferencias se pueden explicar por el carácter iónico opuesto de las dos arcillas, siendo la hidrotalcita un intercambiador aniónico, mientras que la haloisita es un intercambiador catiónico. Las moléculas de melanina cargadas negativamente se repelen de la red de hidrotalcita, lo que resulta en la acomodación ya mencionada de melanina entre las láminas. La superficie de contacto entre ambos componentes es pobre y, por lo tanto, resulta en una débil interacción con el material inorgánico. En cambio, la haloisita promueve una fuerte atracción con las moléculas de melanina, resultando en una interacción óptima entre los materiales orgánicos e inorgánicos, dado la alta área de contacto entre ambos compuestos.

El tipo de interacción determinará la actividad contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*, donde la mejor interacción resultó en un mejor rendimiento. En el caso del

material Mel-HT, la actividad biocida se puede atribuir, en parte, al componente de hidrotalcita ya que posee una gran cantidad de grupos hidroxilo, responsables, en parte, por la actividad letal contra los microorganismos [Rocha Oliveira y col., 2015; Lobo-Sánchez y col., 2018; Velázquez-Herrera y col., 2018]. La melanina también tiene su contribución, teniendo en cuenta que la actividad del híbrido Mel-HT casi se duplica con la integración de la melanina a la hidrotalcita (la CMI disminuyó de 7.5 a 3.9 mg cm<sup>-1</sup>). Por lo tanto, la actividad puede considerarse como la suma de las actividades de los componentes individuales. Por el contrario, en el caso de la muestra Mel-Hall, la actividad más fuerte observada debe atribuirse al componente de melanina, considerando que la haloisita no es activa (Tabla 12). La única contribución de haloisita a la actividad fue dispersar las moléculas de melanina, originando una disposición en forma de capas delgadas. Con estas consideraciones, resulta claro que la actividad de los materiales depende en gran medida de la melanina y la forma en que se integra a los sólidos inorgánicos, es decir, en forma de esferoides en la hidrotalcita o en capas delgadas en la haloisita. Este último modo de integración, donde la melanina se encuentra en finas capas, expone muchos más centros activos que cuando se encuentra en forma de esferoides. En consecuencia, su actividad resulta mayor, en acuerdo con los resultados presentados.

La actividad antifúngica de la melanina impregnada se puede atribuir principalmente a su carácter anfipático: puede ser hidrofílica y estar estable en medios acuosos debido a interacciones electrostáticas entre grupos funcionales cargados (aminas secundarias y carbonilos) y agua o ser lipofílica debido a la unión de los anillos aromáticos de la melanina con las cadenas de hidrocarburos de los fosfolípidos de la membrana celular del microorganismo [Mani y col., 2001; Suzukawa y col., 2012]. Así, este tipo de interacción promueve la difusión de la melanina a través de la membrana nuclear para ejercer una interacción directa con el ADN y las proteínas específicas, rompiendo así las cadenas de ADN y proteínas del microorganismo [Suzukawa y col., 2012; Mo y col., 2019]. El modo de ruptura todavía no está bien definido, dado los pocos reportes existentes sobre estos materiales. Algunos autores [Rocha Oliveira y col., 2015; Lobo-Sánchez y col., 2018] proponen la destrucción por oxidación de los componentes del ADN y de las proteínas, oxidación promovida por los grupos hidroxilos de las arcillas. También, la muerte de los

microorganismos puede ocurrir por asfixia o inanición debidas al bloqueo de los poros de la membrana por elementos disueltos de las arcillas como el aluminio, zinc o silicio.

### 3.6.2.1 Conclusiones parciales

- Se obtuvieron nuevos materiales híbridos compuestos por melanina dispersada en arcilla aniónica y catiónica.
- El modo de dispersión de la melanina resultó muy diferente en los materiales. La melanina se integró a la hidrotalcita en forma de esferoides localizada entre los paquetes de laminillas. En contra, la melanina se dispersó en capas delgadas sobre la superficie externa de los nanotubos de la haloisita.
- La actividad antifúngica dependió mayoritariamente del modo de dispersión de la melanina. A mayor dispersión, mayor exposición de los centros activos de la melanina y, consecuentemente, mayor actividad.
- Así, el material híbrido conformado por melanina-haloisita resultó ser el más activo contra el hongo epidérmico *Trichophyton mentagrophytes* con una CMI de cerca de  $2 \text{ mg cm}^{-1}$ .

## **Conclusiones generales**

Arcillas aniónicas o hidrotalcitas unidas a poliacrilato de sodio resultaron efectivas contra la bacteria *Corinebacterium ammoniagenes*. Este material es prometedor en cuanto a empleo en la composición de pañales para evitar infecciones epidérmicas y malos olores promovidos por dicha bacteria.

La hidrotalcita o arcilla catiónica natural de tipo haloisita impregnadas con melanina fueron sintetizadas por primera vez, resultando en materiales híbridos altamente eficaces para curar enfermedades epidérmicas derivadas del hongo *Trichophyton mentagrophytes*.

Este trabajo demostró la habilidad de las arcillas en la eliminación de microorganismos patógenos de tipo bacterias y hongos. Además, son materiales no nocivos a los humanos, pudiendo encontrar óptimas aplicaciones en el campo farmacológico.

## Referencias

- Alam Q, Bartczak P, Paananen H, Suvanto M, Pakkanen TT (2020). Modification of halloysite nanotubes with xanthene dyes and their application in luminescent polymer nanocomposites *Journal of Luminescence*; 221, 117096, <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117096>. Elsevier B.V.
- Arcayo G.C. (2018) Producción de pellet de lenta liberación a partir de residuos de pulpa de celulosa y poliacrilato de sodio. Tesis de Licenciatura.
- Arens L, Barther D, Landsgesell J, Holm C, Wilhelm M. (2019). Poly(sodium acrylate) hydrogels: Synthesis of various network architectures, local molecular dynamics, salt partitioning, desalination and simulation, *Soft Matter*, 15, 9949-9964.
- Bergadà O, Vicente I., Salagre P., Cesteros Y., Medina F., Sueiras J.E., (2007). Microwave effect during aging on the porosity and basic properties of hydrotalcites. *Microporous Mesoporous Materials*, 101, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2006.11.033>
- Bontchev, R. P.; Liu, S.; Krumhansl, J. L.; Voigt, J.; Nenoff, T. M. (2003). Synthesis, characterization and ion exchange properties of hydrotalcite  $Mg_6Al_2(OH)_{16}(A)_x(A')_{2-x} \cdot 4H_2O$  (A, A')  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$  and  $NO_3^-$ ,  $2 \geq x \geq 0$  derivatives). *Chemistry of Materials*. 15, 3669–3675.
- Braterman, P. S., Xu, Z. P., Yarberry, F. (2004). Layered double hydroxides (LDHs). *Handbook of Layered Materials*, 8, 373-474.
- Campos A.R. (2017). Estudio del proceso de hidratación en cementantes compuestos mediante el uso de poliacrilato de sodio como método de curado interno. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León
- Castro A.M. (2014) Bacteriología médica basada en problemas, Editorial El Manual Moderno, 2 edición, 18-19.
- Cavani, F.; Trifiro, F.; Vaccari, A. (1991). Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. *Catalysis Today*. 11, 173-301, Elsevier B.V.

- Collins, M. D. (1987). Transfer of *Brevibacterium ammoniagenes* (Cooke and Keith) to the Genus *Corynebacterium* as *Corynebacterium ammoniagenes* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 442-443.
- Costa, T.G., Feldhaus, M.J., Vilhena, F.S., Heller, M., Micke, G.A., Oliveira, A.S., Brighente, I.M.C., Monteiro, F.B.F., Creczynski-Pasa, T.B., Szpoganicz, B., (2015). Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Antioxidant Activity of DOPA Melanin Modified by Amino Acids: Melanin-Like Oligomeric Aggregates. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26, 273–281. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140277>
- Costa, T.G., Younger, R., Poe, C., Farmer, P.J., Szpoganicz, B., (2012). Studies on Synthetic and Natural Melanin and Its Affinity for Fe(III) Ion. *Bioinorganic Chemistry Applications*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/712840>
- David, R. (2012). Antimicrobials: Why zinc is bad for bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 4-4.
- Di Cosimo, J. I., Diez, V. K., Xu, M., Iglesia, E., & Apestegua, C. R. (1998) Structure and surface and catalytic properties of Mg-Al basic oxides, *Journal of Catalysis*, 178(2), 499-510.
- d’Ischia, M., Wakamatsu, K., Cicoira, F., Di Mauro, E., Garcia-Borron, J.C., Commo, S., Galván, I., Ghanem, G., Kenzo, K., Meredith, P., Pezzella, A., Santato, C., Sarna, T., Simon, J.D., Zecca, L., Zucca, F.A., Napolitano, A., Ito, S., (2015). Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. *Journal of International Federation of Pigment Cell Melanoma Research*, 28, 520–544. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12393>
- Drezdzon, M. A. (1988). Synthesis of Isopolymetalate-Pillared Hydrotalcite via Organic-Anion-Pillared Precursors. *Inorganic Chemistry*, 27(25), 4628-4632.
- Duan, X., Evans, D.G., He, J., Kang, Y., Khan, A.I., Leroux, F., Li, B., Li, F., O’Hare, D., Slade, R.C.T., Taviot-Gueho, C., Wei, M., Williams, G.R., (2006). Layered double hydroxides. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. <https://doi.org/10.1007/b100426>

- Ehrlich, H. L. (1997). Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(6), 687-692, Springer- Verlag.
- Evans, D. G., y Slade, R. C. (2006). *Structural Aspects of Layered Double Hydroxides, Structure and Bonding*, 119, 1-87, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Falcón, J.M., Sawczen, T., Aoki, I.V., (2015). Dodecylamine-Loaded Halloysite Nanocontainers for Active Anticorrosion Coatings. *Frontiers in Materials*. 2, 69, <https://doi.org/10.3389/fmats.2015.00069>
- Fetter, G., Botello, A., Lara, V.H., Bosch, P. (2001). Detrital  $Mg(OH)_2$  and  $Al(OH)_3$  in Microwaved Hydrotalcites. *Journal of Porous Materials*, 8, 227–232.
- Fernández R, Segundo C, Arenas R, Silva D, Guzmán A. (2002) Determinación de las variedades de Trichophyton mentagrophytes en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Bioquímica, Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe*, 27(2), 41–45.
- Goodman, G., Bercovich, D., (2008). Melanin directly converts light for vertebrate metabolic use: Heuristic thoughts on birds, Icarus and dark human skin. *Medical Hypotheses*, 71, 190–202. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2008.03.038>, Elsevier B.V.
- He Q, Yin S, Sato T. (2004) Synthesis and photochemical properties of zinc-aluminum layered double hydroxide/organic UV ray absorbing molecule/silica nanocomposites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65, 395–402, Elsevier B.V.
- Hernández, J. (2010). Síntesis a nivel de laboratorio de poliacrilatos de sodio de bajo peso molecular para la industria cerámica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(6), 392–406.
- Huang L, Li DQ, Evans DG, Duan X. (2005). Preparation of highly dispersed MgO and its bactericidal properties. *European Physical Journal D*, 34, 321-323.
- Ishige T, Honda K, Shimizu S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9,174–180. DOI 10.1016/j.cbpa.2005.02.001
- Jansen, E., Michels, M., Van Til, M., & Doelman, P. (1994). Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils*, 17, 177-184, Springer-Verlag.

- Jimenez-Galisteo Guadalupe. (2015). Actividad formadora de canales transmembrana en la superficie de *Gordonia jacobaea*. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona.
- Jobbágy, M., & Regazzoni, A. E., (2011), Dissolution of nano-size Mg–Al–Cl hydrotalcite in aqueous media. *Applied Clay Science*, 51(3), 366-369, Elsevier B.V.
- Joussein, E., Petit, S., Churchman, J., Theng, B., Righi, D., Delvaux, B., (2005). Halloysite clay minerals a review. *Clay Minerals*, 40, 383–426. <https://doi.org/10.1180/0009855054040180>
- Kang, H., Liu, X., Zhang, S., Li, J., (2017). Functionalization of halloysite nanotubes (HNTs) via mussel-inspired surface modification and silane grafting for HNTs/soy protein isolate nanocomposite film preparation. *Royal Society of Chemistry Advances*, 7, 24140–24148. <https://doi.org/10.1039/c7ra02987j>
- Kiran, G.S., Dhasayan, A., Lipton, A.N., Selvin, J., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N.A., (2014). Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *Journal. Nanobiotechnology*, 12, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-18>
- Klopprogge, J.T., Hickey, L., Frost, R.L., (2004). FT-Raman and FT-IR spectroscopic study of synthetic Mg/Zn/Al-hydrotalcites. *Journal of Raman Spectroscopy*, 35, 967–974. <https://doi.org/10.1002/jrs.1244>
- León Vallejo, A.M. (2018) Fibras De Celulosa Funcionalizadas con hidrotalcitas con propiedades bactericidas. Tesis de doctorado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- León-Vallejo, A.M., Velázquez-Herrera, F.D., Sampieri, Á., Landeta-Cortés, G. & Fetter, G. (2019) Study of layered double hydroxides as bactericidal materials against *Corynebacterium ammoniagenes*, a bacterium responsible for producing bad odors from human urine and skin infections. *Applied Clay Science*, 180, 105194.
- Li, C., Zhao, Y., Zhu, T., Li, Y., Ruan, J., Li, G., (2018). Effective solvent-free oxidation of cyclohexene to allylic products with oxygen by mesoporous etched halloysite nanotube supported  $\text{Co}^{2+}$ . *Royal Society of Chemestr Advances*, 8, 14870–14878. <https://doi.org/10.1039/c7ra11245a>
- Li Y, Wang J, Li Z, Liu Q, Liu J, Liu L. (2013). Ultrasound assisted synthesis of Ca-Al hydrotalcite for U (VI) and Cr (VI) adsorption. *Chemical Engineering Journal*, 218, 295-302. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.051>

- Lin YSE, Vidic RD, Stout JE, McCartney CA, Yu VL. (1998) Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. *Water Research*, 32(7), 1997–2000, Elsevier Science.
- Liu, Y., Simon, J.D., (2003). The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Research*, 16, 72–80. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00009.x>
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J. (1997). PCR. Identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer, 46, 1043–1046.
- Lobo-Sánchez, M., Nájera-Meléndez, G., Luna, G., Segura-Pérez, V., Rivera, J.A., Fetter, G., (2018). ZnAl layered double hydroxides impregnated with eucalyptus oil as efficient hybrid materials against multi-resistant bacteria. *Applied Clay Science*, 153, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.11.017>.
- Loures F and Levitz S., (2015). XTT Assay of Antifungal Activity. <http://www.bioprotocol.org/e1543>, 5 (2015) 2–6.
- Mani, I, Sharma, V., Tamboli, I., Raman, G., (2001). Interaction of melanin with proteins- The importance of an acidic intramelanosomal pH, *Pigment Cell Research*, 14, 170-179. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140306.x>
- Martínez, D.R., Carbajal, G.G. (2012). Hidroxidos dobles laminares: Arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances en Química, Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe*, 7(1), 87–99.
- McDevitt, C. A., Ogunniyi, A. D., Valkov, E., Lawrence, M. C., Kobe, B., McEwan, A. G., & Paton, J. C. (2011). A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathogens*, 7(11), 357.
- Mo, X., Preston, S., Zaidi, M.R. (2019). Macroenvironment-gene-microenvironment interactions in ultraviolet radiation-induced melanomagenesis. *Advances in Cancer Research*, 144, 1-54. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.008>, Elsevier Inc.
- Montaño Arias N.M, Sandova Pérez A.L, Camargo Ricalde S.L, Sánchez Yáñez J.M., (2010) Los microorganismos: pequeños gigantes. *Red de Revistas Científicas de América Latina y del Caribe*, 17(77), 15–23.

- Murray, P. R. (2009) *Microbiología médica*, editorial Elsevier, 5 edición, 11-17.
- Netzahualcoyotzi, I., Galicia, V., Rivera, J.A., Fetter, G., Bosch, P., (2016). Stabilization of hemoglobin in double layered hydroxides to be used in carbon monoxide bio-oxidation I-synthesis and characterization. *Catalysis Today*, 266, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.11.022>
- Nenoff, P., Hermann, J., Gräser, Y., (2007). Trichophyton mentagrophytes sive interdigitabile? A dermatophyte in the course of time. *Journal compilation*, 5(3), 198–202. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2007.06180.x
- Paredes, S.P., Valenzuela, M.A., Fetter, G. & Flores, S.O. (2011) TiO<sub>2</sub>/MgAl layered double hydroxides mechanical mixtures as efficient photocatalysts in phenol degradation. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 72, 914–919, Elsevier B.V.
- Park, H., Yang, I., Choi, M., Jang, K.-S., Jung, J.C., Choi, K.-Y., (2020). Engineering of melanin biopolymer by co-expression of MelC tyrosinase with CYP102G4 monooxygenase: Structural composition understanding by 15 tesla FT-ICR MS analysis. *Biochemical Engineering Journal Pre-proof*, 157, 107530 . <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2020.107530>
- Pimentel-Ramírez, E., Castillo-Andamayo, D., Quintana, M, Maurtua, D., Villegas, L., Díaz (2015). Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatológica Herediana*, 25(4):268.
- Rivera, J.A., Fetter, G. & Bosch, P. (2006) Microwave power effect on hydrotalcite synthesis. *Microporous and Mesoporous Materials*, 89, 306–314, <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2005.10.041>.
- Rocabado D., (2011) Los Hongos, Antecedentes Diversidad de hongos en Bolivia • Aspectos benéficos Aspectos perjudiciales, Glosario. Diana Rocabado, Research Gate, 62, 1–20.
- Rocha Oliveira, G., Dias do Amaral, L.J., Giovanela, M., da Silva Crespo, J., Fetter, G., Rivera, J.A., Sampieri, A. & Bosch, P. (2015) Bactericidal Performance of chlorophyllin-copper hydrotalcite compounds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226, 226–316, Springer International.

- Roelofs, J.C.A.A., van Bokhoven, J.A., van Dillen, A.J., Geus, J.W., de Jong, K.P., (2002). The thermal decomposition of Mg-Al hydrotalcites: Effects of interlayer anions and characteristics of the final structure. *Chemistry A European Journal*, 8, 5571–5579.
- Roy, S., Rhim, J.W., (2019). Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanin. *Food Hydrocolloids*, 90, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.056>.
- Sacsquispe Contreras R.E, Velásquez Pomar J., (2002). Manual de procedimientos anual para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud, 1-67.
- Sahnoun, S., Boutahala, M., Zaghouane-Boudiaf, H., Zerroual, L., (2016). Trichlorophenol removal from aqueous solutions by modified halloysite: kinetic and equilibrium studies, *Desalination and Water Treatment*, 57, 15941–15951. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1075159>
- Samaranayake, Y.H., Cheung, B.P.K., Parahitiyawa, N, Senevitatne, C.J, Yau, J.Y.Y, Yeung, K.W.S, (2009) Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology*, ScienceDirect, 54(2),115–26.
- Sampieri, Á., Fetter, G., Pfeiffer, H., Bosch, P., (2007). Carbonate phobic (Zn,Mn)-Al hydrotalcite-like compounds. *Solid State Sciences*, 9, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.solidstatedsciences.2007.03.014>
- Segura-Pérez V, Lobo Sánchez M, Velázquez-Herrera FD, Frías-Vázquez DA, Reyes-Cervantes E, Fetter G. (2020) Hydrotalcite/hydroxyapatite composites with high bacterial activity against clinical bacteria. A new alternative to prevent osteomyelitis diseases, *Microporous and Mesoporous Mater*, 298, 110069.
- Sommer, A., Romero, A., Fetter, G., Palomares, E., Bosch, P., (2013). Exploring and tuning the anchorage of chlorophyllin molecules on anionic clays. *Catalysis Today*, 212, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.03.014>

- Sunayama, S., Sato, T., Kawamoto, A., Ohkubo, A., & Suzuki, T. (2002). Disinfection effect of hydrotalcite compounds containing antimicrobial metals against microorganisms in water. *Biocontrol Science*, 7(2), 75-81.
- Suzukawa, A.A., Vieira, A., Winnischofer, S.M., Scalfio, A.C., Di Mascio, P., Ferreira, A.M., Ravanat, J.L., Martins, D.L., Rocha, M.E., Martinez, G.R., (2012). Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. *Free Radical Biology Medicine*, 52, 1945-1953. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.039>
- Szczepanik, B., Słomkiewicz, P., Garnuszek, M., Rogala, P., Banaś, D., Kubala-Kukuś, A., Stabrawa, I., (2017). Effect of Temperature on Halloysite Acid Treatment for Efficient Chloroaniline Removal from Aqueous Solutions. *Clays Clay Minerals*, 65 (3), 155–167. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2017.064056>
- Taroni, T., Meroni, D., Fidecka, K., Maggioni, D., Longhi, M., Ardizzone, S., (2019). Halloysite nanotubes functionalization with phosphonic acids: Role of surface charge on molecule localization and reversibility. *Applied Surface Science*, 486, 466–473. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2019.04.264>
- Vargas- Rodríguez, Y.M., Gómez, V., Vázquez, E., García, A., Aguilar, G., Murrieta, H. (2008). Caracterización espectroscópica de una montmorillonita mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 25(1):135–44.
- Velázquez-Herrera, F.D., Fetter, G., (2020). Hydrotalcites with heterogeneous anion distributions: a first approach to produce new materials to be used as vehicles for a successive delivery of compounds. *Clay Minerals*. 1–9. <https://doi.org/10.1180/clm.2020.2>
- Velázquez-Herrera, F.D., Fetter, G., Rosato, V., Pereyra, A.M., Basaldella, E.I., (2018). Effect of structure, morphology and chemical composition of Zn-Al, Mg/Zn-Al and Cu/Zn-Al hydrotalcites on their antifungal activity against *A. niger*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, 3376–3383. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.069>
- Velázquez-Herrera, F.D., Fetter, G., (2020). Buenas arcillas, malas arcillas. *Ciencias y*

Desarrollo, (edición digital), Editorial CINVESTAV. ISSN: 0185-1411.

Wang, L., Li, Y., Li, Y., (2019). Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24, *International Journal Biological Macromolecules*, 1-47. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.11.061>

Zhao, S.; Yi, H.; Tang, X.; Gao, F.; Yu, Q.; Zhou, Y.; Wang, J.; Huang, Y.; Yang, Z. (2016). Enhancement effects of ultrasound assisted in the synthesis of NiAl hydrotalcite for carbonyl sulfide removal, *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 336–342.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*.;56(6), 1875–81.

## ANEXO 1

Como ejemplo se determinaron los valores para la muestra **ZnAl 2:1 a 100 mg/mL**.

Varianza

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Datos

1.3, 0.7, 1.5

Determinación de la media

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{3} = \frac{1.3 + 0.7 + 1.5}{3} = 1.1666$$

Conociendo que la media es 1.1666 y n=3 se calcula las desviaciones.

Datos	Desviación ( $x_i - \bar{x}$ )	Desviación al cuadrado ( $(x_i - \bar{x})^2$ )
1.3	1.3-1.1666=0.1334	$(0.1334)^2 = 0.0177$
0.7	0.7-1.1666=-0.4666	$(-0.4666)^2 = 0.2177$
1.5	1.5-1.1666=0.3334	$(0.3334)^2 = 0.1111$
		$\sum = 0.3465$

Sustituyendo los valores en la fórmula de la varianza, conociendo que n=3:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$
$$s^2 = \frac{0.3465}{3 - 1} = \frac{0.3465}{2} = 0.17325$$

Calculando la desviación estándar se sustituyen los valores en la ecuación:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$
$$s = \sqrt{0.17325} = 0.4162$$



## Synthesis of novel hybrid melanin-hydroxalcite with potential lethal activity against microorganisms

Mónica Cruz-Hernández<sup>a</sup>, Franchescoli D. Velázquez-Herrera<sup>a</sup>, Marcelo Giovanela<sup>b</sup>, Janaina da Silva Crespo<sup>b</sup>, Geolar Fetter<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, PUE, Mexico

<sup>b</sup> Universidade de Caxias do Sul, Área do Conhecimento de Ciências Exatas e Engenharias, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 April 2020

Received in revised form 21 July 2020

Accepted 29 July 2020

Available online 2 August 2020

#### Keywords:

Layered double hydroxides

Anionic clays

Melanin

Microorganisms

### ABSTRACT

The bactericidal and fungicidal properties of the hydroxalcite materials have recently been exposed, which contrasts with melanin whose properties have been recognized for a long time. Thus, the combination of both materials should result in a solid with enhanced activity against pathogenic microorganisms, with possible applications in the medicinal field. Considering this, in this work, a novel kind of nano-hybrid material composed of melanin and ZnAl-hydroxalcite is presented. The successfully synthesis was achieved by the impregnation method. The resulting hybrid material was formed by an intimate combination of both components, characterized by the grouping of nano-spheres of the melanin organic chains with the inorganic hydroxalcite nano-lamellae. This kind of arrangement considerably increased its textural properties.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Melanin is a type of biological pigmented macromolecule produced in nature by different species including humans and other animals, microorganisms and plants. It is produced by the oligomerization, in several grades, of a  $C_{18}H_{10}N_2O_4$  monomer [1,2].

Besides the biological functions of melanin, nowadays it is beginning to find important applications, mostly in the technological, medicinal and pharmacological fields, where, in this last case, melanin has the capability to kill pathogenic microorganisms although its activity is generally low [1]. An alternative to solve this problem could be the dispersion of the melanin in porous materials to enhance its surface area and thus, promote its activity. Among the porous materials that could fit well as a support for the melanin molecules, the anionic clays or hydroxalcites seem to be the ideal ones, considering they have positively charged layers facilitating the bonding with the negatively charged melanin molecules [2,3]. Moreover, hydroxalcites have performed well against many microorganisms [3,4], and the impregnation of melanin could result in hybrid materials with enhanced anti-microorganism properties as that formed by zinc oxide nanoparticles capped with melanin to form films with carrageenan [5]. Thus, in this work, ZnAl-hydroxalcites were synthesized and used as a

support for a natural melanin compound, aiming to obtain a hybrid melanin-hydroxalcite material having close interaction between components, which could provide an enhancement in lethal activity.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Hydroxalcite synthesis

The hydroxalcite synthesis procedure followed a similar procedure described elsewhere [3], and briefly consisted of a mix of a 2.5 mol/L solution of Al and Zn nitrate salts (Sigma-Aldrich, 98%) with 2 mol/L of a NaOH solution (Baker, 28%). The amounts of reagents were calculated to obtain a  $M^{2+}/M^{3+}$  molar ratio of 3.0. The co-precipitation reaction was performed at a constant pH of 9.0, being ultrasonicated (Elmasonic P30H, 390 W, 80 kHz) for 30 min. Afterwards, the solids were washed with distilled water until the pH was 8.0. The solids were dried in an oven at 60 °C for 24 h (HT sample).

#### 2.2. Preparation of melanin

The preparation of melanin followed a modified procedure, described by Liu and Simon [6], from a commercially refrigerated ink of *Sepia officinalis*. Deionized water was used to dilute 20 mL of ink to 500 mL over magnetic stirring for 30 min. The diluted

\* Corresponding author.

E-mail address: [geolar.fetter@correo.buap.mx](mailto:geolar.fetter@correo.buap.mx) (G. Fetter).

ink was centrifuged in a Labnet Hermle Z300 equipment at 6000 rpm for 15 min and then the supernatant was removed. The precipitated solids formed a sticky mass and were re-suspended in 500 mL of deionized water and then centrifuged. This washing procedure was repeated six times to ensure the preparation of pure melanin (M sample), which was stored in a wet form.

### 2.3. Hydrotalcite impregnation with melanin

One gram of the ZnAl-hydrotalcite (HT sample) was dispersed in 300 mL of deionized water with constant stirring. Then, 500  $\mu$ L of the melanin solution, produced as described above, were added to the solid suspensions and stirred at room temperature for 1 h. The solids were recovered by decantation and dried in an oven at 60 °C for 24 h, resulting in the hybrid labeled M-HT.

### 2.4. Materials characterization

X-ray diffraction technique was used to identify the materials and their structures, employing a Bruker D8 Discover apparatus equipped with a LynxEye type detector. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to identify the functional groups of the melanin and solids with a Digilab Excalibur FTS 3000 equipment. Nitrogen physisorption technique was used to obtain the BET specific surface areas of the materials using a Micromeritics ASAP 2020 apparatus. Samples were pre-treated at 150 °C for 6 h under high vacuum pressure. Scanning electron microscopy with field emission gun (FEG-SEM) was employed to characterize the surface morphology using a Mira 3 Tescan microscope.

## 3. Results and discussion

X-ray diffraction patterns of the melanin, the hydrotalcite and the hybrid melanin-clay are shown in Fig. 1. The melanin pattern does not show any diffraction peaks, illustrating the amorphous character of this compound [7]. In contrast, for the HT sample, the intense (003), (006), (012), (015), (110) and (113) diffraction peaks determine a well crystallized hydrotalcite (JCPDS card 014-0191), but considering the broadness of the diffraction peaks, the hydrotalcite must be comprised of small particles. From the position of the (003) diffraction peak, a basal spacing ( $d_{003}$ ) of 8.6 Å resulted, showing that nitrates are the major compensating anions [8]. When the melanin was integrated into the HT sample, the X-ray pattern almost reproduced that of the hydrotalcite with the dif-

ference being that a shoulder in the (003) peak appeared, most probably attributed to an arrangement of anions in a crown mode [8]. The melanin cannot be noticed in the diffractogram of the hybrid material. The melanin, indeed, is not crystalline and, considering that no changes in the base line of the diffractogram exist, the melanin must be composed of very small particles. By FTIR spectroscopy (figure not shown), it was not possible to confirm the presence of melanin in the hybrid material as all bands corresponding to the functional groups of the hydrotalcite overlapped those of the melanin.

By nitrogen physisorption technique, the adsorption-desorption profile of the hybrid M-HT material presented similar profiles to that of the HT clay, the difference being that the hysteresis loop started at a higher relative pressure. This indicates that the adsorption behavior of the clay is influenced by the melanin component, as is shown by the pore size distributions curves presented in Fig. 2. The M-HT sample is composed of the assemblage of both types of porosity: those of ca. 30 Å, corresponding to the hydrotalcite, and those in the range 70–430 Å, corresponding to the melanin compound. The wide pore diameter distribution of the melanin could be correlated to a very open arrangement of the melanin chains and, thus, promoting an expansion of the hydrotalcite lamellae.

The specific surface area of the hydrotalcite (23.0 m<sup>2</sup>/g) was similar to that of the melanin (18.8 m<sup>2</sup>/g), although this latter value contrasts with values of near zero found by other authors [9], confirming that, in the present case, the melanin organic chains are assembled in a very porous arrangement. For the hybrid M-HT sample, the surface area increased considerably to 250.3 m<sup>2</sup>/g, indicating that the melanin promotes an expansion of the hydrotalcite lamellae arrangement of particles resulting in a very porous structure, probably of the type “house of cards”. Such an arrangement is revealed by the FEG-SEM image of the hybrid melanin-hydrotalcite shown in Fig. 3.

The melanin agglomerates appear in the form of spherules (indicated by white circles in Fig. 3) with diameter sizes ranging from 30 to 90 nm, confirming that the already proposed open arrangement of the melanin chains resembled a ball of wool. The hydrotalcite component can be identified by a flake-like arrangement of particles, with approximately 500 nm diameter and 30 nm thickness, which characteristics are often found for hydrotalcites [4]. Furthermore, it can be observed that the melanin agglomerates are homogeneously dispersed between the hydrotalcite lamellae, probably caused by the opposite charges of the

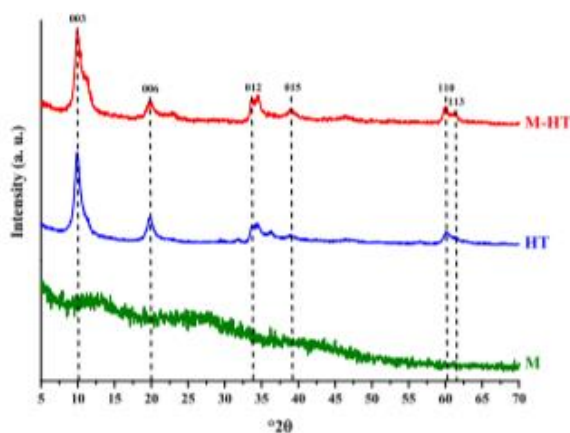


Fig. 1. X-ray diffraction patterns of the melanin (M), the ZnAl-hydrotalcite (HT) and hybrid melanin-hydrotalcite sample (M-HT).

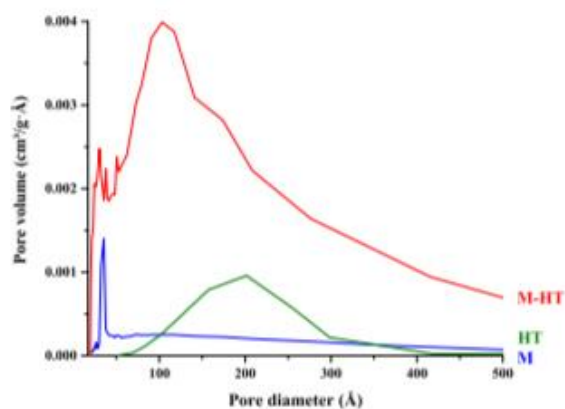


Fig. 2. Pore sizes distributions of the melanin (M), hydrotalcite (HT) and hybrid melanin-hydrotalcite (M-HT).

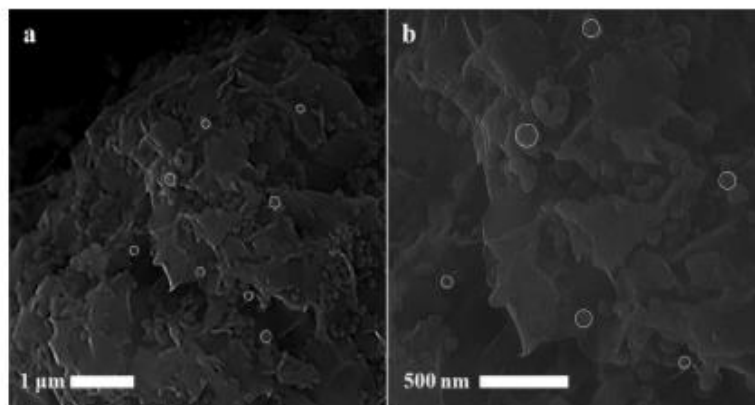


Fig. 3. FEG-SEM image of the melanin-hydroxalcite hybrid material (M-HT sample) at a magnification of a) 50,000 X and b) 100,000 X.

components, as hydroxalcite has positively charged layers while melanin is negatively charged.

Considering these results, and knowing the antimicrobial activity of the individual components, the resulting hybrid hydroxalcite should present an increased activity, with a prospect to be very efficient in medicinal applications, for example, in ointment formulations for use in skin infections caused by pathogens microorganisms. Note that the hybrid melanin-clay is a nontoxic compound, environmentally friendly and somewhat biodegradable.

#### 4. Conclusions

A novel kind of nano-hybrid material composed by melanin-hydroxalcite was successfully synthesized by impregnating a natural melanin in an oligodynamic ZnAl-hydroxalcite. The results show that the hybrid material was composed of an intimate association of nano-lamellae of the hydroxalcite component with nanospheres of melanin. This kind of combination resulted in a hybrid material with extraordinary enhanced textural properties, showing a surface area as high as 250.3 m<sup>2</sup>/g and a very large meso-pore size distribution. Thus, considering the especially features of the novel melanin-hydroxalcite nanomaterial presented in this work, an expectation of usage in medicinal applications could be highly envisaged, although other applications, for example, in photocatalysis or in electronics as photo-collector devices must be considered.

#### CRedit authorship contribution statement

**Mónica Cruz-Hernández:** Investigation, Validation, Conceptualization, Methodology. **Francescoli D. Velázquez-Herrera:** Investigation, Validation, Writing - review & editing. **Marcelo Giovanela:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Janaina Silva Crespo:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Geolar Fetter:** Investigation, Validation, Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

Authors acknowledge VIEP-BUAP (Mexico) and CNPq, FINEP and LCMIC-UCS (Brazil) for financial support. M. Cruz-Hernández and F.D. Velázquez-Herrera thank CONACYT (Mexico) for the fellowships.

#### References

- [1] M. Caldas, A.C. Santos, F. Veiga, R. Rebelo, R.L. Reis, V.M. Correlo, Melanin nanoparticles as a promising tool for biomedical applications – a review, *Acta Biomater.* 105 (2020) 26–43, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.044>.
- [2] T.G. Costa, R. Younger, C. Poe, P.J. Farmer, B. Szpoganicz, Studies on synthetic and natural melanin and its affinity for Fe(III) ion, *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012 (2012), <https://doi.org/10.1155/2012/712840>.
- [3] V. Segura-Pérez, M. Lobo-Sánchez, F.D. Velázquez-Herrera, D.A. Frías-Vázquez, E. Reyes-Cervantes, G. Fetter, Hydroxalcite/hydroxyapatite composites with high bacterial activity against clinical bacteria. A new alternative to prevent osteomyelitis diseases, *Microporous Mesoporous Mater.* 298 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110069>.
- [4] F.D. Velázquez-Herrera, G. Fetter, V. Rosato, A.M. Pereyra, E.I. Basaldella, Effect of structure, morphology and chemical composition of Zn-Al, Mg/Zn-Al and Cu/Zn-Al hydroxalcites on their antifungal activity against *A. niger*, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 3376–3383, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.069>.
- [5] S. Roy, J.W. Rhim, Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanin, *Food Hydrocoll.* 90 (2019) 500–507, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.056>.
- [6] Y. Liu, J.D. Simon, The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*, *Pigment Cell Res.* 16 (2003) 72–80, <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00009.x>.
- [7] V. Capozzi, G. Perna, P. Carbone, A. Gallone, M. Lastella, E. Mezzenga, G. Quartucci, M. Ambrico, V. Augelli, P.F. Biagi, T. Ligonzo, A. Minafra, L. Schiavulli, M. Pallara, R. Cicero, Optical and photoelectronic properties of melanin, *Thin Solid Films.* 511–512 (2006) 362–366, <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2005.12.065>.
- [8] F.D. Velázquez-Herrera, G. Fetter, Hydroxalcites with heterogeneous anion distributions: a first approach to produce new materials to be used as vehicles for a successive delivery of compounds, *Clay Miner.* 55 (2020) 31–39, <https://doi.org/10.1180/clm.2020.2>.
- [9] H. Park, I. Yang, M. Choi, K.-S. Jang, J.C. Jung, K.-Y. Choi, Engineering of melanin biopolymer by co-expression of MelC tyrosinase with CYP102G4 monooxygenase: Structural composition understanding by 15 tesla FT-ICR MS analysis, *Biochem. Eng. J.* 157 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107530>.